

**PCT**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

<b>(51) Clasificación Internacional de Patentes <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 31/60</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Número de publicación internacional:</b> <b>WO 99/61030</b> <b>(43) Fecha de publicación internacional:</b> 2 de Diciembre de 1999 (02.12.99)
<b>(21) Solicitud internacional:</b> PCT/ES99/00154 <b>(22) Fecha de la presentación internacional:</b> 26 de Mayo de 1999 (26.05.99) <b>(30) Datos relativos a la prioridad:</b> P 9801154 27 de Mayo de 1998 (27.05.98) ES <b>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):</b> J. URIACH & CIA, S.A. [ES/ES]; Decano Bahi, 59-67, E-08026 Barcelona (ES). <b>(72) Inventores; e</b> <b>(75) Inventores/solicitantes (sólo US):</b> MERLOS ROCA, Manuel [ES/ES]; Calle Copernico, 15, E-08021 Barcelona (ES). FERNANDEZ DE ARRIBA, Alberto [ES/ES]; Calle Secretari Coloma, 12 bis, E-08025 Barcelona (ES). CAVALCANTI DE MARIA, Fernando [ES/ES]; Calle Sibelius, 9, E-08026 Barcelona (ES). MIRALLES ACOSTA, Agusti [ES/ES]; Calle Conestable de Portugal, 19, E-08400 Granollers (ES). SANCHEZ CRESPO, Mariano [ES/ES]; Calle Manuel Mucientes, 1, E-47008 Valladolid (ES). GARCIA RAFANELL, Julian [ES/ES]; Calle Rosello, 416, E-08025 Barcelona (ES). FORN DALMAU, Javier [ES/ES]; Paseo de Los Tilos, 25, E-08034 Barcelona (ES).		<b>(74) Mandatario:</b> ISERN JARA, Jaime; Avenida Diagonal, 463 bis 2º, E-08036 Barcelona (ES). <b>(81) Estados designados:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publicada</b> <i>Con informe de búsqueda internacional.</i>
<b>(54) Title:</b> UTILIZATION OF 2-HYDROXY-4-TRIFLUOROMETHYLBENZOIC ACID DERIVATIVES AS INHIBITORS OF THE ACTIVATION OF THE NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTORS NF- $\kappa$ B <b>(54) Título:</b> USO DE DERIVADOS DEL ACIDO 2-HIDROXI-4-TRIFLUOROMETILBENZOICO COMO INHIBIDORES DE LA ACTIVACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION NUCLEAR NF- $\kappa$ B <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the use of 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid derivatives as inhibitors of the activation of the nuclear transcription factor NF-<math>\kappa</math>B. The invention also relates to the utilization of 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid derivatives for the preparation of medicaments to treat or prevent of pathologies associated to the activation of NF-<math>\kappa</math>B and/or the expression of genes which are dependent on or regulated by, at least partially, NF-<math>\kappa</math>B in mammals, including humans.</p> <b>(57) Resumen</b> <p>La invención se refiere al uso de derivados del ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico para inhibir la activación del factor de transcripción NF-<math>\kappa</math>B. La invención se refiere también a la utilización de derivados del ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico para la preparación de medicamentos para el tratamiento o prevención de patologías asociadas a la activación del NF-<math>\kappa</math>B y/o la expresión de genes dependientes o regulados, al menos en parte, a través del NF-<math>\kappa</math>B en mamíferos, incluido el hombre.</p>		

### UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Mali	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelandia	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

Uso de derivados del ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico como inhibidores de la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B.

Sector de la técnica.

La presente invención se refiere a inhibidores del factor de transcripción nuclear kappaB (NF- $\kappa$ B) y a su uso en terapia. Específicamente, la presente invención se refiere al uso de derivados del ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico para inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Estado de la técnica anterior a la invención.

El control de la expresión de proteínas juega un papel clave tanto en el mantenimiento del normal funcionamiento de las células y por extensión de los organismos, como en el desarrollo de procesos patológicos. Este control se realiza a través de los llamados factores de transcripción. Uno de estos factores es el conjunto de proteínas conocido como el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, formado por una familia de complejos diméricos íntimamente relacionados. El NF- $\kappa$ B existe en forma inactiva en el citoplasma de muchos tipos de células. En respuesta a un estímulo, se activa y se transloca al núcleo, donde se une al ADN y regula la transcripción de diferentes genes. La activación del NF- $\kappa$ B puede ser inducida por diferentes agentes como citocinas inflamatorias (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ )), mitógenos, lipopolisacáridos bacterianos (LPS), virus, agentes oxidantes (por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ozono), ésteres de forbol y luz ultravioleta. Entre los diferentes genes cuya expresión se halla regulada a través del NF- $\kappa$ B se encuentran muchos genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria. Así, entre otros, el NF- $\kappa$ B regula la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), TNF- $\alpha$  y factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF); quimiocinas como interleucina-8 (IL-8), RANTES, proteína inflamatoria de los

macrófagos-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ), proteína quimiotáctica de los monocitos-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) y eotaxina; enzimas inflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), 5-lipoxigenasa (5-LO) y fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>); moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), la molécula de adhesión vascular-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) y E-selectina; y receptores como el receptor de la interleucina-2 y el receptor de células T (P.J. Barnes y I.M. Adcock, *Trends Pharmacol. Sci.* 1997, 18, 46-50).

10 Se ha asociado disfunciones en la activación del NF- $\kappa$ B y sus genes dependientes con diversas patologías como inflamación aguda, shock séptico, rechazo de trasplantes, daño por radiación, daño por isquemia y reperfusión y enfermedades neurodegenerativas (P.A. Baeuerle y T. Henkel, *Annu. Rev. Immunol.* 1994, 12, 141-179), asma y otras enfermedades inflamatorias crónicas  
15 (P.J. Barnes y I.M. Adcock, *Trends Pharmacol. Sci.* 1997, 18, 46-50), osteoporosis (Y. Abu-Amer y M. Mehrad Tondravi, *Nature Med.* 1997, 3(11), 1189-1190), y cáncer (M.A. Sovak y cols., *J. Clin. Invest.* 1997, 100 (12), 2952-2960). Asimismo, se han detectado niveles elevados de NF- $\kappa$ B en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (H. Asahara y cols., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1995, 37(5), 827-  
20 32), en muestras de sistema nervioso central de enfermos de esclerosis múltiple (D. Gveric y cols., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998, 57(2), 168-78) y en muestras de tejido aterosclerótico (K. Brand y cols., *J. Clin. Invest.* 1996, 97(7), 1715-22), y se ha visto que el péptido amiloide  $\beta$ , que se deposita en placas de enfermos de Alzheimer, activa el NF- $\kappa$ B en células del sistema nervioso  
25 central (C. Behl y cols., *Cell* 1994, 77, 817-827). También se ha observado un gran incremento de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en neuronas dopaminérgicas de enfermos de Parkinson (S. Hunot y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94(14), 7531-7536). Igualmente, se ha descrito que el NF- $\kappa$ B interviene en la activación transcripcional de virus como el virus de la inmunodeficiencia  
30 humana (VIH), citomegalovirus, adenovirus y herpesvirus.

Por otro lado, se ha demostrado que las citocinas, enzimas inflamatorias,

moléculas de adhesión y otras proteínas cuya expresión se halla regulada por el NF- $\kappa$ B juegan un papel importante en un amplio abanico de patologías como inflamación; asma; síndrome del distrés respiratorio del adulto (adult respiratory distress syndrome, ARDS); enfermedades inmunoinflamatorias y autoinmunes como artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y glomerulonefritis; artrosis; shock séptico; aterosclerosis; cáncer; osteoporosis; parto prematuro; rechazo de trasplantes; enfermedades neurodegenerativas como la demencia, incluido la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica; e infecciones víricas.

A la vista de lo anterior, los agentes que sean capaces de modular la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción podrían ser de gran utilidad como agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de las patologías anteriormente citadas. Es por ello que es de gran interés encontrar agentes que sean capaces de regular la actividad del NF- $\kappa$ B.

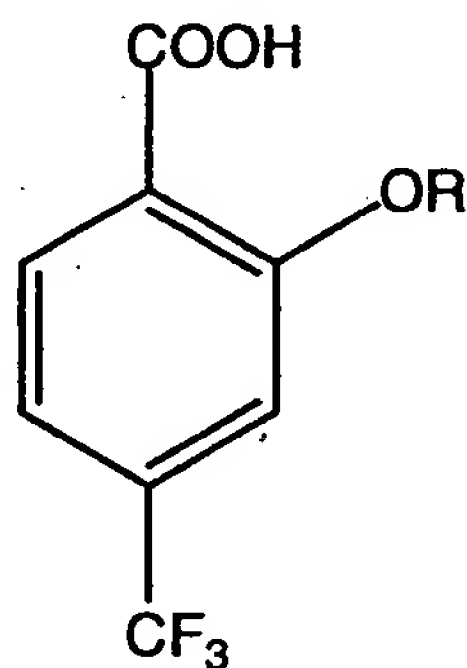
El ácido 2-acetiloxi-4-trifluorometilbenzoico, más conocido por su Denominación Común Internacional (DCI) triflusal, es un inhibidor de la agregación plaquetaria comercializado para el tratamiento de enfermedades tromboembólicas bajo la marca Disgren®. Su principal metabolito, el ácido 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoico (conocido también por las siglas HTB), posee también una notable actividad como antiagregante plaquetario. Ambos compuestos se hallan descritos en la patente US 4,096,252.

Los presentes inventores han encontrado que, sorprendentemente, tanto el triflusal como su metabolito, el HTB, inhiben la activación del NF- $\kappa$ B. Asimismo, se ha encontrado que ambos compuestos son potentes inhibidores de la expresión de genes regulados transcripcionalmente por el NF- $\kappa$ B. Debido a esta nueva actividad ahora descubierta, el triflusal y el HTB son potencialmente útiles en el tratamiento o prevención de patologías en las que la activación del NF- $\kappa$ B y sus genes dependientes se halla implicada, como las anteriormente citadas.

Explicación de la invención.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el triflusal y su metabolito, el HTB, son potentes inhibidores de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Como se ha mencionado anteriormente, el NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción ubicuo que actúa uniéndose al ADN, activando de este modo la expresión de diferentes genes, muchos de ellos relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria. La presente invención demuestra que el triflusal y el HTB inhiben la activación del NF- $\kappa$ B inducida por diferentes agentes como TNF- $\alpha$ , inmunocomplejos y LPS en diferentes tipos de células, como células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), macrófagos y monocitos. Asimismo, se demuestra también que el triflusal y el HTB inhiben la expresión de diversas proteínas en cuya regulación transcripcional interviene el NF- $\kappa$ B, como por ejemplo VCAM-1, iNOS, COX-2, MCP-1 y TNF- $\alpha$ . Por ello, el triflusal y el HTB son útiles como agentes terapéuticos o preventivos en aquellas situaciones patológicas en las que participa el NF- $\kappa$ B y/o las proteínas cuya expresión se halla regulada por este factor de transcripción.

El triflusal y el HTB se pueden representar de una forma genérica mediante la fórmula I:



(I)

donde R representa hidrógeno (HTB) ó COCH<sub>3</sub> (triflusal).

Es objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la activación del



factor de transcripción NF- $\kappa$ B. El uso de una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula I o un profármaco del mismo quedan también incluidos dentro del ámbito de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un compuesto de  
5 fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de genes dependientes y/o regulados, al menos en parte, a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. En una realización preferida, el gen codifica la IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, eotaxina, iNOS, COX-2,  
10 5-LO, cPLA<sub>2</sub>, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, el receptor de la IL-2 o el receptor de células T, y más preferiblemente codifica VCAM-1, iNOS, COX-2, MCP-1 y TNF- $\alpha$ .

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
15 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de patologías asociadas a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción. En una realización preferida, la patología es inflamación; asma; síndrome del distrés respiratorio del adulto (adult respiratory distress syndrome, ARDS);  
20 enfermedades inmunoinflamatorias y autoinmunes como artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y glomerulonefritis; artrosis; shock séptico; aterosclerosis; cáncer; osteoporosis; parto prematuro; rechazo de trasplantes; enfermedades neurodegenerativas como la demencia, incluido la  
25 enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica; e infecciones víricas.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de la COX-2.

30 Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para

la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la COX-2. En una realización preferida, la enfermedad mediada por la COX-2 es artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, artrosis, parto prematuro, demencia o cáncer.

5 Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de VCAM-1.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
10 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por VCAM-1. En una realización preferida, la enfermedad mediada por VCAM-1 es aterosclerosis, artritis reumatoidea, lupus, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, rinitis alérgica y metástasis de tumores.

15 Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de la iNOS.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
20 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la iNOS. En una realización preferida la enfermedad mediada por la iNOS es inflamación, shock séptico, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades neurodegenerativas.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de  
25 fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión del TNF- $\alpha$ .

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
30 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por el TNF- $\alpha$ . En una realización preferida la enfermedad mediada por el TNF- $\alpha$  es artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa y otras enfermedades artríticas, artrosis, sepsis,



shock séptico, shock endotóxico, síndrome de shock tóxico, síndrome del  
distrés respiratorio del adulto, malaria cerebral, enfermedad inflamatoria  
pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar, hepatitis,  
osteoporosis y otras enfermedades relacionadas con la resorción ósea, daño por  
5 reperfusión, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, lupus, fiebre y mialgias  
debidas a infecciones, caquexia, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida  
(SIDA), enfermedad inflamatoria intestinal y piresis.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de  
fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
10 la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de la MCP-1.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de  
fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de  
enfermedades mediadas por la MCP-1. En una realización preferida la  
15 enfermedad mediada por la MCP-1 es aterosclerosis, glomerulonefritis, artritis  
reumatoidea, fibrosis pulmonar, restenosis, asma, psoriasis, enfermedad  
inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple y rechazo de trasplantes.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de  
fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
20 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de  
enfermedades neurodegenerativas, particularmente la demencia, la  
enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de  
fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
25 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de  
enfermedades inmunoinflamatorias y autoinmunes, preferiblemente la  
artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, esclerosis múltiple,  
psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y glomerulonefritis.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de  
30 fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la  
artrosis.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del

5 cáncer.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la

10 aterosclerosis.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para la prevención de parto prematuro.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para

15 la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la inflamación.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del asma

20 o el síndrome del distrés respiratorio del adulto.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del

25 shock séptico.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la

30 osteoporosis.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de

35 infecciones víricas.

Es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del rechazo de trasplantes.

5 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
10 inhibir la expresión de genes dependientes y/o regulados, al menos en parte, a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para el tratamiento o prevención de patologías asociadas a la activación del factor de  
15 transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir la expresión de la COX-2.

20 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la COX-2, preferiblemente artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, artrosis, parto prematuro, demencia o cáncer.

25 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir la expresión de VCAM-1.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
30 el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por VCAM-1, preferiblemente aterosclerosis, artritis reumatoidea, lupus, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, rinitis alérgica y metástasis de

tumores.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir la expresión de la iNOS.

5 La invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la iNOS, preferiblemente inflamación, shock séptico, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades neurodegenerativas.

10 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir la expresión del TNF- $\alpha$ .

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
15 el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por el TNF- $\alpha$ , preferiblemente artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa y otras enfermedades artríticas, artrosis, sepsis, shock séptico, shock endotóxico, síndrome de shock tóxico, síndrome del distrés respiratorio del adulto, malaria cerebral, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis  
20 pulmonar, fibrosis pulmonar, hepatitis, osteoporosis y otras enfermedades relacionadas con la resorción ósea, daño por reperfusión, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, lupus, fiebre y mialgias debidas a infecciones, caquexia, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad inflamatoria intestinal y piresis.

25 La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para inhibir la expresión de la MCP-1.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para  
30 el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la MCP-1, preferiblemente aterosclerosis, glomerulonefritis, artritis reumatoidea, fibrosis pulmonar, restenosis, asma, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal,

esclerosis múltiple y rechazo de trasplantes.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad  
5 terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo. El mamífero es preferiblemente un ser humano.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la expresión de genes dependientes y/o regulados, al menos en parte, a través del  
10 factor de transcripción NF- $\kappa$ B en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para el  
15 tratamiento o prevención de patologías asociadas a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco  
20 del mismo.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la expresión de la COX-2 en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un  
25 compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la COX-2, preferiblemente artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, artrosis, parto prematuro, demencia o cáncer, en un mamífero necesitado del  
30 mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la expresión de VCAM-1 en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por VCAM-1, preferiblemente aterosclerosis, artritis reumatoidea, lupus, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, rinitis alérgica y metástasis de tumores, en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la expresión de la iNOS en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La invención también proporciona un método para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la iNOS, preferiblemente inflamación, shock séptico, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades neurodegenerativas, en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la expresión del TNF- $\alpha$  en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por el TNF- $\alpha$ , preferiblemente artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa y



otras enfermedades artríticas, artrosis, sepsis, shock séptico, shock endotóxico, síndrome de shock tóxico, síndrome del distrés respiratorio del adulto, malaria cerebral, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar, hepatitis, osteoporosis y otras enfermedades  
5 relacionadas con la resorción ósea, daño por reperfusión, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, lupus, fiebre y mialgias debidas a infecciones, caquexia, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad inflamatoria intestinal y piresis, en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente  
10 efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la expresión de la MCP-1 en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un  
15 compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la MCP-1, preferiblemente aterosclerosis, glomerulonefritis, artritis reumatoidea, fibrosis  
20 pulmonar, restenosis, asma, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple y rechazo de trasplantes, en un mamífero necesitado del mismo, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

Queda incluida también dentro del ámbito de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para el tratamiento o prevención de patologías  
25 asociadas a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción, y más preferiblemente para el tratamiento o prevención de la inflamación; asma; síndrome del distrés respiratorio del adulto (adult respiratory distress syndrome, ARDS);  
30

enfermedades inmunoinflamatorias y autoinmunes como artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y glomerulonefritis; artrosis; shock séptico; aterosclerosis; cáncer; osteoporosis; parto prematuro; rechazo de trasplantes; enfermedades neurodegenerativas como la demencia, incluido la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica; e infecciones víricas.

Las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto de fórmula I incluyen cualquiera de las sales utilizadas habitualmente en química farmacéutica, como por ejemplo las sales con cationes inorgánicos como sodio, potasio, calcio, magnesio, litio, aluminio, zinc, etc así como las sales formadas con amoníaco y otras aminas farmacéuticamente aceptables.

A lo largo de la presente descripción, se entiende por profármaco de un compuesto de fórmula I cualquier compuesto precursor de un compuesto de fórmula I que es capaz de metabolizarse y liberar *in vivo* un compuesto de fórmula I, es decir el triflusal o el HTB.

Por NF- $\kappa$ B se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas conocidas por este nombre.

Por gen dependiente y/o regulado, al menos en parte, a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B se entiende cualquier gen que posea en su región promotora uno o más puntos de unión con el NF- $\kappa$ B. La lista de genes regulados por el NF- $\kappa$ B mencionada anteriormente en el apartado "Estado de la técnica anterior a la invención" se cita a modo de ejemplo y no debe entenderse en ningún caso como limitativa.

Por patología asociada a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de este factor de transcripción se entiende cualquier enfermedad o estado patológico donde intervenga, al menos en parte, la activación del NF- $\kappa$ B y/o las proteínas cuya expresión (es decir la expresión del gen que las codifica) se halla regulada por este factor de transcripción. Las listas de estas enfermedades mencionadas anteriormente se citan a modo de ejemplo y no deben entenderse en ningún caso como

limitando el ámbito de la presente invención.

Bajo el término enfermedades neurodegenerativas se incluyen, entre otras, las demencias, como la enfermedad de Alzheimer; las enfermedades con trastornos del movimiento, como la enfermedad de Parkinson; las ataxias progresivas; y las amiotrofias de origen neuronal, como la esclerosis lateral amiotrófica.

Por demencia se entiende cualquier patología caracterizada por un deterioro de las funciones cognitivas, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, demencias post-traumáticas o infecciosas así como situaciones mixtas.

El término enfermedad inflamatoria intestinal incluye tanto colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn así como cualquier otro tipo de variante de enfermedad inflamatoria intestinal.

El término rechazo de trasplantes se refiere tanto al rechazo de trasplantes de tejidos, como por ejemplo la enfermedad de injerto contra huesped, como de órganos.

Procedimientos para preparar el triflusal o el HTB se hallan descritos en la patente americana antes citada (US 4,096,252).

Como se ha dicho anteriormente, los compuestos de fórmula I inhiben la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y por tanto pueden utilizarse para inhibir dicha activación en mamíferos, preferiblemente en seres humanos. La dosis de un compuesto de fórmula I necesaria para modular la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, o cualquier otro uso aquí descrito, dependerá de la patología tratada, de la gravedad de los síntomas, de la edad y peso corporal del paciente así como de la vía de administración elegida. Cualquier entendido en la materia podrá fácilmente determinar las dosis adecuadas en función de estos factores sin tener que recurrir a una excesiva experimentación. En terapia humana, generalmente las dosis estarán comprendidas entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 3000 mg al día de un compuesto de fórmula I, que podrán ser administrados en una o varias unidades de dosis. Dependiendo de la patología concreta a tratar y de la situación del paciente, sin embargo, podrían ser necesarias dosis fuera de este

rango, que como ya se ha mencionado antes podrán ser determinadas por un entendido en la materia sin necesidad de demasiada experimentación.

Los compuestos de fórmula I pueden ser administrados en forma de cualquier formulación farmacéutica, la naturaleza de la cual, como es bien sabido, dependerá de la vía de administración y de la naturaleza de la patología a tratar. Estas composiciones farmacéuticas se pueden preparar por técnicas convencionales, empleando excipientes o vehículos compatibles y farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de estas composiciones incluyen cápsulas, comprimidos, jarabes, polvos y granulados para la formación de soluciones extemporáneas, preparaciones inyectables, etc. Una vía preferida de administración de los compuestos de fórmula I es por vía oral. Por ejemplo, pueden administrarse en forma de cápsulas de gelatina dura que contengan por ejemplo 50, 100, 200, 300, 400 ó 500 mg de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo.

#### 15 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el efecto inhibidor del triflusal y HTB sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  en cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC).

La Figura 2 ilustra el efecto inhibidor del triflusal y HTB sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B inducida por inmunocomplejos (IC) en macrófagos de rata.

La Figura 3 (A y B) ilustra el efecto inhibidor del HTB sobre la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células mononucleares de sangre periférica humana.

La Figura 4 ilustra el efecto inhibidor del triflusal y HTB sobre la expresión del ARNm de VCAM-1 inducida por TNF- $\alpha$  en HUVEC.

La Figura 5 ilustra el efecto inhibidor del HTB (5A) y triflusal (5B) sobre la producción de nitrito inducida por inmunocomplejos en macrófagos de rata.

La Figura 6 ilustra el efecto del triflusal y HTB sobre la COX-2 inducida por LPS en células mononucleares humanas: (6A) efecto inhibidor del triflusal sobre la expresión de COX-2; (6B) efecto inhibidor del HTB sobre la expresión de COX-2; (6C) inhibición de la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) producida

por triflusal; (6D) inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> producida por HTB.

La Figura 7 ilustra el efecto inhibidor del triflusal administrado por vía oral sobre la expresión de COX-2 (7A) y la producción de PGE<sub>2</sub> (7B) en un modelo de inflamación inducido por carragenina en rata.

5 La Figura 8 ilustra el efecto inhibidor del HTB sobre la expresión de MCP-1 inducida por inmunocomplejos (IC) en la línea monocítica humana THP-1.

La Figura 9 ilustra el efecto inhibidor del triflusal y HTB sobre la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células  
10 mononucleares de sangre periférica humana.

Los siguientes ejemplos ilustran la utilidad del triflusal y el HTB como inhibidores de la activación del NF- $\kappa$ B y sus genes dependientes. De ningún modo deben interpretarse como limitando el ámbito de la presente invención.

15 Las siguientes abreviaturas se han utilizado en los ejemplos:

EDTA: ácido etilendiamintetraacético

DTT: 1,4-ditiotreitol

pb: pares de bases

20 PBS: tampón fosfato salino (*phosphate-buffered saline*)

RT-PCR: reacción de cadena de la polimerasa transcriptasa inversa  
(*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

dNTP: desoxirribonucleósidos trifosfato

ADN: ácido desoxirribonucleico

25 ARN: ácido ribonucleico

MTT: azul de tiazolio

TBS: tampón Tris salino (*Tris-buffered saline*)

ATP: adenosil trifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

30 SFB: suero fetal bovino

Ejemplo 1: Inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  en HUVEC.

A. CULTIVO CELULAR

5

Las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron obtenidas por el procedimiento de Dejana y cols. (*J. Cell Biol* 1987, 104(5), 1403-1411), mediante el tratamiento del cordón umbilical con 0,2% de colagenasa P de *C.histolyticum* (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se cultivaron las células en el medio M199 (Flow Lab, Herts, U.K.) con 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina, 2,5  $\mu$ g/ml de anfotericina B y 20% de suero fetal bovino. El cultivo inicial fue realizado en frascos de 25 cm<sup>2</sup> de plástico. Después de 24 horas se lavaron las células para extraer aquellas células no adheridas a la superficie del frasco. A continuación se añadió el mismo medio de cultivo reconstituido con 10% de suero fetal bovino, 50  $\mu$ g/ml de factor suplementario de crecimiento endotelial y 100  $\mu$ g/ml de heparina. Después de 5-7 días de cultivo, las células llegaron a la confluencia y fueron despegadas de la superficie del frasco con 0,05% de tripsina y 0,02% de EDTA (Flow Lab). La reacción fue inhibida con la adición de suero fetal bovino y posteriormente las células se lavaron y sembraron en medio de cultivo. Las células crecieron hasta la confluencia en frascos cubiertos con gelatina. Las células usadas en los experimentos pertenecían a los estadios 2-7.

25 B. TRATAMIENTO DE LAS CELULAS HUVEC CON TNF- $\alpha$  Y ENSAYO DE MODIFICACION DE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY, EMSA).

En este experimento, las células HUVEC fueron preincubadas con Triflusal y HTB, a concentraciones en ambos casos de 2 y 4 mM. Posteriormente estas células fueron estimuladas con 100 U/ml de TNF- $\alpha$  (Genzyme

30



Diagnostics, Cambridge, MA USA) durante 90 minutos. A continuación, las células HUVEC fueron lavadas en tampón de lisis hipotónico frío (10 mM tampón HEPES-KOH, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT (1,4-ditiotreitol), 0,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml leupeptina y 0,6% Nonidet P-40) y mantenidas en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se aplicó una fuerte agitación con vortex durante 10 segundos. Las células no lisadas se eliminaron por centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos. Los núcleos se aislaron por centrifugación a 15000 x g durante 1 minuto en una microcentrífuga. El *pellet* nuclear se resuspendió en un tampón de extracción altamente salino (25% glicerol y 0,5 M KCl). El extracto nuclear se obtuvo mediante una centrifugación durante 30 minutos a 105000 x g en una ultracentrífuga Optima Tl (Beckmann) usando un rotor TLA 100.2. Un oligonucleótido de 22 pb de doble cadena que contenía secuencias de NF-κB fue usado como sonda. Esta sonda fue marcada en su extremo terminal con (γ-<sup>32</sup>P)ATP mediante el enzima T4 polinucleótido quinasa y purificada por minicolumna de cromatografía. La secuencia κB utilizada fue, 5'-AGTTCAGGGGAATTTCCTGAACT-3' y su complementario 5'-GCCTGGGAAATTCCCCTGAACT-3'. 10 µg de la proteína nuclear purificada fueron incubados durante 20 minutos en hielo con la sonda marcada radiactivamente (2-6 x 10<sup>4</sup> cpm) en 25 µl de tampón de reacción compuesto por 2 µg de poli(dI-dC), 10 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 8% Ficoll y 4% glicerol. Los complejos nucleoprotein-oligonucleótido fueron resueltos por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante en tampón Tris-borato/EDTA durante 3 horas a 175 V y a 4°C. El gel fue secado y autorradiografiado con una pantalla intensificadora a -80°C y de 2 a 12 horas. La especificidad del complejo ADN(sonda)-proteína fue confirmada por la competición de la sonda marcada con <sup>32</sup>P con un exceso 300 veces superior de sonda no marcada, con lo cual no se observó presencia de sonda marcada en el complejo ADN-proteína (datos no mostrados). La muestra

señalada como control corresponde a células incubadas durante 90 minutos en ausencia de TNF- $\alpha$ .

### C. RESULTADOS

5

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1. Tanto triflusal como HTB inhiben de forma concentración-dependiente la activación de NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  en HUVEC.

#### 10 Ejemplo 2: Inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B inducida por inmunocomplejos (IC) en macrófagos de rata.

##### A. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATA

15

Se extrajeron células de la cavidad peritoneal de rata y se resuspendieron en medio de cultivo DMEM sin suero al que se había añadido previamente 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina, 50  $\mu$ g/ml de gentamicina, 2 mM de glutamina y 0,5 mM de L-arginina. Las células se incubaron 2 horas en  
20 placas de cultivo a 37°C y aquellas que no se adhirieron a las placas se eliminaron mediante tres lavados consecutivos con el mismo medio fresco. Más del 95% de las células adheridas a la placa resultaron ser macrófagos, como se comprobó por su capacidad para fagocitar partículas de zimosan y marcaje no específico de esterasa. Los macrófagos se mantuvieron a 37° C en una atmósfera  
25 de 5% CO<sub>2</sub> y dos horas después se eliminaron las células en suspensión y los macrófagos peritoneales adheridos a la placa se incubaron con 100  $\mu$ g/ml de Inmunocomplejos IgG/ovoalbúmina preparados a partir de antisuero de conejo durante dos horas en presencia o ausencia (vehículo) de triflusal o HTB (4 mM, ambos) .

30

##### B. ENSAYO DE LA MODIFICACION DE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA (EMSA).

Una vez terminada la incubación los macrófagos se lavaron dos veces con PBS y se determinó el grado de activación (unión al ADN) del factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la técnica de EMSA, descrita detalladamente en el Ejemplo 1.

### C. RESULTADOS

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos con triflusal y HTB en este experimento. Se muestra un ejemplo representativo de los obtenidos en dos experimentos independientes. Tanto el triflusal como el HTB inhiben de forma pronunciada la activación del NF- $\kappa$ B inducida por inmunocomplejos en macrófagos de rata.

Ejemplo 3: Inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células mononucleares de sangre periférica humana (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)

#### A. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

Las células mononucleares (PBMC) fueron obtenidas a partir de sangre de voluntarios sanos del Hospital de Sant Pau (Barcelona) que no habían ingerido ningún tipo de fármaco antiinflamatorio durante un periodo no inferior a las dos semanas previas a la extracción. Se partió de un volumen aproximado de 80 ml de sangre humana heparinizada (10 U/ml) que se diluyó (1:1) con PBS (pH 7,4; Dulbecco) sin calcio, ni magnesio ni bicarbonato sódico.

En tubos Falcon de 50 ml se pipetearon 15 ml de una solución de Ficoll ( $d=1,077$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ; Biochrom KG). Sobre esta solución se añadió cuidadosamente un volumen aproximado de 25 ml por tubo de la sangre previamente diluida con PBS y se centrifugaron a  $1200g$  durante 20 minutos. Las células mononucleares se concentran en una interfase blanca entre el plasma y la

solución de Ficoll. Se extrajo esta interfase con una pipeta Pasteur y se diluyó 1:1 en PBS. Se centrifugó a 300g durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 50 ml de PBS y se volvió a centrifugar a 200g durante 10 min, con el fin de eliminar la contaminación por plaquetas. Por último, el  
5 precipitado de esta centrifugación se resuspendió en 20 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (GibcoBRL) con un 10% de suero fetal bovino.

Las PBMC aisladas se analizaron mediante una tinción Wright-Giemsa estándar para comprobar que mostraban una morfología de células mononucleares normales y determinar los distintos tipos celulares aislados  
10 (una media de 90% de linfocitos y 10% de monocitos). Previamente a los distintos tratamientos se analizó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión del azul Tripan. Las células se diluyeron a una concentración de 2,5 millones/ml con medio RPMI al 10% de suero fetal bovino y se incubaron (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 1 hora en placas de 6 pocillos (2 ml/pocillo, 5 millones de  
15 PBMC) sin añadir ningún fármaco (control) o añadiendo HTB (1-3 mM). A continuación las células se incubaron durante 10 minutos más en presencia de 10 µg/ml de lipopolisacárido de *E.coli* (LPS, serotipo 026:B6; Sigma). Una vez terminada la incubación, se tomó una muestra (100 µl) para efectuar un recuento celular y controles de viabilidad mediante la capacidad de conversión  
20 de la sal soluble de tetrazolio, MTT, en el producto insoluble formazán por las deshidrogenasas mitocondriales (test de MTT). Se realizaron además incubaciones de las células con HTB (3 mM) pero sin añadir LPS. En todos los casos la viabilidad fue igual o superior al 95%.

## 25 B. ENSAYO DE LA MODIFICACION DE LA MOVILIDAD ELECTROFORETICA (EMSA).

Una vez terminada la incubación las PBMC se lavaron dos veces con PBS y se determinó el grado de activación (unión al ADN) del factor de  
30 transcripción NF-κB mediante la técnica de EMSA, descrita detalladamente en el Ejemplo 1.

## C. RESULTADOS

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos con HTB en este experimento. Se muestra un ejemplo representativo de los obtenidos en dos experimentos independientes. El HTB inhibe de forma pronunciada la activación del NF- $\kappa$ B inducida por LPS en PBMC humanas.

### Ejemplo 4: Inhibición de la expresión de VCAM-1 en HUVEC inducida por TNF- $\alpha$

10

#### A. SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA DE ADNc Y PCR DE VCAM-1

Los cebadores (*primers*) utilizados para la detección del ARNm de VCAM-1 por RT-PCR fueron diseñados a partir de la secuencia humana del gen (EMBL/Gen Bank AC: M30257), usando la versión 9.1 del programa Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. Fueron las secuencias 5'-TGTCAGTGTAAAGCTGCAAG-3' y 5'-TTCCAGCCTGGTTAATTC-3', correspondientes a los nucleótidos 1090-1108 y 1589-1572 (L. Osborn y cols., *Cell* 1989, 59(6), 1203-1211). El ARN total de las células cultivadas es extraído según el método de isotiocianato de guanidinio (P. Chomczynski y N. Sacchi, *Anal Biochem.* 1987, 162(1), 156-159). La primera cadena de ADNc es sintetizada a partir del ARN total mediante una reacción de transcripción inversa. La reacción se realiza con 0,2 mg/ml de ARN total (precalentado a 68°C durante 10 minutos), 2,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 20 U de inhibidor de ARNasa ribonucleica, 4  $\mu$ l de tampón 5 X, 2  $\mu$ l de 0,1 M DTT, 4  $\mu$ l de dNTP 2,5 mM, 1  $\mu$ l de hexanucleótidos 0,1 mM y 200 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney. La reacción está realizada a 37°C, durante 60 minutos y con un volumen de 20  $\mu$ l. El ADNc de VCAM-1 ha estado amplificado por PCR en una reacción conteniendo 2  $\mu$ l de ADN, 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 2,5  $\mu$ l de tampón 10 X, 0,75  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1,0  $\mu$ l de dNTP 2,5 mM, 1,25  $\mu$ l de cada uno de los cebadores (sentido y antisentido), y 0,25  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa 5 U/ml. El control

negativo se realiza con agua, incluyéndose en cada una de las reacciones de PCR. Las condiciones de amplificación han sido: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, y a continuación 30 ciclos compuestos por: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, unión de los cebadores (*annealing*) a 59 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto; finalmente se realizó un ciclo de extensión a 72 °C durante 7 minutos. La cantidad relativa de cada ADNc amplificado se determina por la densidad de las bandas teñidas con bromuro de etidio y analizadas por el sistema de documentación Gel Doc y el software Molecular Analyst de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. La expresión de  $\beta$ -actina se usa como control para el ensayo de la expresión de un gen expresado constitutivamente.

En concreto, se estudió el efecto de Triflusal (4 mM) y HTB (4 mM) en la regulación de la expresión del ARNm de la molécula VCAM-1 inducida por TNF- $\alpha$  (100 U/ml) en HUVEC. Así, las células fueron incubadas en presencia o ausencia de TNF- $\alpha$  y con Triflusal y HTB. Una hora después, el ARN total fue extraído y sometido a la reacción de transcripción inversa. Posteriormente, se realizó una reacción de amplificación por PCR con los cebadores designados para las secuencias de las moléculas VCAM-1 y  $\beta$ -actina humana. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,8% y cuantificados posteriormente. El peso molecular de los productos de amplificación fue determinado a partir de la migración electroforética de los marcadores de ADN.

## B. RESULTADOS

25

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 4. Tanto triflusal como HTB a una concentración 4 mM producen una inhibición completa de la expresión del ARNm de VCAM-1 inducida por TNF- $\alpha$  en HUVEC. La falta de actividad sobre la expresión del ARNm de  $\beta$ -actina evidencia la selectividad de los compuestos ensayados por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

30



Ejemplo 5: Inhibición de la expresión de iNOS en macrófagos peritoneales de rata inducidos por inmunocomplejos.

5 A. DETERMINACION DE LA PRODUCCION DE NO POR MACROFAGOS PERITONEALES DE RATA.

Se obtuvieron células peritoneales de rata que se resuspendieron en un medio de cultivo DMEM sin suero y suplementado con antibióticos. Los  
10 macrófagos se aislaron por su capacidad para adherirse a las placas de cultivo tras 2 horas de incubación a 37° C. Las células no adherentes se descartaron y se comprobó por su capacidad para fagocitar partículas de zimosan y marcaje no específico de esterasa que el 95% de las células adheridas eran macrófagos. Las placas de cultivo se mantuvieron a 37° C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, los  
15 macrófagos peritoneales adheridos a la placa se incubaron con 100 µg/ml de inmunocomplejos de IgG/ovoalbumina en presencia o ausencia (Control) de triflusal o HTB (0,1-20 mM, ambos). Los fármacos se añadieron 10 minutos antes de la adición de IgG/ovoalbúmina y la producción de NO se determinó como el nitrito presente al cabo de 24 horas.

20

B. DETERMINACION DEL NO Y NITRITO.

La expresión de iNOS se midió de forma indirecta como producción de NO. El NO liberado por los cultivos de macrófagos se determinó  
25 indirectamente mediante la acumulación de nitritos. A un mililitro de cultivo celular (0,5 millones de células en medio sin rojo fenol) se le añadió 100 µl de una solución de 1 mM de ácido sulfanílico y 100 mM HCl (concentración final). Tras incubar la mezcla durante cinco minutos, se aspiró el medio y se centrifugó en una microcentrífuga de eppendorf. Se añadieron 50  
30 µl de naftilendiamina (1 mM en la mezcla) y después de 15 minutos de reacción se midió la absorbancia de la muestra a 548 nm comparandola con un

patrón de  $\text{NaNO}_2$ . La producción de NO se expresó como nmoles de  $\text{NO}_2^-/\text{mg}$  de proteína.

### C. RESULTADOS

5

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la figura 5A para el HTB y en la figura 5B para el triflusal. Los puntos representan la media  $\pm$  error estándar (EE) de 7 a 9 experimentos por duplicado. Las  $\text{CI}_{50}$  calculadas para el triflusal y el HTB a partir de las gráficas correspondientes fueron  $1,13 \pm 0,12$  y  $1,84 \pm 0,34$  mM, respectivamente.

10

Resultados similares se obtuvieron al incubar los macrófagos con LPS en lugar de inmunocomplejos.

15

Ejemplo 6: Inhibición de la expresión de COX-2 inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células mononucleares de sangre periférica humana (peripheral blood mononuclear cells, PBMC).

20

#### A. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

25

Las células mononucleares (PBMC) fueron obtenidas a partir de sangre de voluntarios sanos del Hospital de Sant Pau (Barcelona) que no habían ingerido ningún tipo de fármaco antiinflamatorio durante un periodo no inferior a las dos semanas previas a la extracción. Se partió de un volumen aproximado de 80 ml de sangre humana heparinizada (10 U/ml) que se diluyó (1:1) con PBS (pH 7,4; Dulbecco) sin calcio, ni magnesio ni bicarbonato sódico.

30

En tubos Falcon de 50 ml se pipetearon 15 ml de una solución de Ficoll ( $d=1,077$  a  $20^\circ\text{C}$ ; Biochrom KG). Sobre esta solución se añadió cuidadosamente un volumen aproximado de 25 ml por tubo de la sangre previamente diluida con PBS y se centrifugaron a  $1200g$  durante 20 minutos. Las células mononucleares se concentran en una interfase blanca entre el plasma y la

solución de Ficoll. Se extrajo esta interfase con una pipeta Pasteur y se diluyó 1:1 en PBS. Se centrifugó a 300g, 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 50 ml de PBS y se volvió a centrifugar a 200g durante 10 min, con el fin de eliminar la contaminación por plaquetas. Por último, el precipitado de esta centrifugación se resuspendió en 20 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (GibcoBRL) con un 10% de suero fetal bovino.

Las PBMC aisladas se analizaron mediante una tinción Wright-Giemsa estándar para comprobar que mostraban una morfología de células mononucleares normales y determinar los distintos tipos celulares aislados (una media de 90% de linfocitos y 10% de monocitos). Las células se diluyeron a una concentración de 2,5 millones /ml con medio RPMI al 10% de suero fetal bovino y se incubaron (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 19 horas en placas de 6 pocillos (2 ml/pocillo, 5 millones de PBMC). Las incubaciones se realizaron en presencia de 10 µg/ml de lipopolisacárido de *E.coli* (LPS, serotipo 026:B6; Sigma) sin añadir ningún fármaco (control) o añadiendo además Triflusal o HTB (0,1-5 mM). Previamente a la incubación se realizaron pruebas de viabilidad celular mediante la prueba de exclusión del azul Tripan. Una vez terminada la incubación, se tomó una muestra (100 µl) para efectuar un recuento celular y controles de viabilidad mediante la capacidad de conversión de la sal soluble de tetrazolio, MTT, en el producto insoluble formazán por las deshidrogenasas mitocondriales (test de MTT). Se realizaron además incubaciones de las células con HTB y Triflusal a iguales concentraciones pero sin añadir LPS. En todos los casos la viabilidad fue igual o superior al 95% tanto al principio del experimento como al cabo de 19 horas de incubación.

## B. ENSAYOS DE INMUNOBLOT

Una vez terminada la incubación, las células se centrifugaron 5 min a 1000g. El sobrenadante se guardó a -70°C para la determinación de niveles de prostaglandina E<sub>2</sub> como índice de la actividad COX-2, y el precipitado se resuspendió en 5 ml de PBS y se volvió a centrifugar (5 min, 1000g). El precipitado de esta última centrifugación se resuspendió en 50 µl de tampón de lisis celular (PBS con 1% de Nonidet P-40 y 1 mM de EDTA) y se incubó en

hielo 15 minutos. La mezcla resultante se centrifugó a 20000g 15 min y se recuperó el sobrenadante, del cual se extrajeron 5 µl que se diluyeron 1/20 con PBS para la determinación de la concentración de proteína, mediante el Reactivo de Ensayo de Proteínas BCA (Pierce).

5 El sobrenadante restante fue entonces mezclado 1:1 con tampón de carga de electroforesis (Tris 50 mM; SDS 2% w/v; glicerol 10% v/v; β-mercaptoetanol, 50 µl/ml y azul de bromofenol, 2 mg/ml) y hervido durante 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10000g, 2 min y posteriormente sometidas a una electroforesis discontinua en SDS-Poliacrilamida (4% gel  
10 concentrador/7,5% gel separador) a una intensidad variable y un voltaje fijo de 200 V, hasta que el frente se acerca a unos milímetros del final del gel (1 hora, aproximadamente).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, mediante un sistema refrigerado TE 22 *Mighty Small Transfer Unit* (Hoefer), a  
15 un voltaje de 100 V durante 2 horas. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se dejaron toda la noche en agitación a 4°C en tampón de bloqueo (1:4 leche en polvo descremada en TBS con Tween 20 al 0,1%).

Las membranas bloqueadas se incubaron 1 hora en agitación con un anticuerpo policlonal de cabra contra COX-2 humana (Santa Cruz  
20 Biotechnology, Inc.) y una vez lavadas se incubaron 1 hora más con un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano (Rabbit Anti-goat IgG-Horseradish Peroxidase, Immunopure, Pierce) y el anticuerpo unido a la proteína se visualizó mediante quimioluminiscencia (ECL, Amershan).

Posteriormente, los sobrenadantes de cada experimento que se habían  
25 conservado a -70°C, se descongelaron y se valoró la cantidad de PGE<sub>2</sub> en solución. Para ello se utilizaron kits de ELISA específicos (Amershan-Biotrak RPN22).

### C. RESULTADOS

30

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en este experimento.

Los resultados mostrados corresponden a dos inmunoblots representativos de los obtenidos en cinco experimentos independientes (Fig. 6A: triflusal; Fig. 6B: HTB) y a la media  $\pm$  EE de la cuantificación de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos correspondientes a dichos experimentos (Fig. 6C: triflusal; Fig. 6D: HTB). Tanto el triflusal como el HTB inhiben de forma concentración-dependiente la expresión de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub>.

Ejemplo 7: inhibición de la expresión de COX-2 en células de exudado inflamatorio en la rata

10

A. METODOLOGÍA GENERAL

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado ratas Lewis (175-200 g). Las ratas se distribuyeron al azar en grupos de 5 animales. A cada grupo se les produjo un "saco de aire" ("air pouch") por la inyección subcutánea e interescapular de 20 ml de aire estéril. Para mantener el saco de aire, cada dos días se les administró 10 ml de aire adicional. Transcurridos 7 días de la inyección inicial de aire, a cada grupo se le administró en el saco de aire, 2 ml de una solución de carragenina al 1 % para producir la reacción inflamatoria. El compuesto a ensayar se administra por vía oral 30 min. antes de la administración de carragenina. Los animales se sacrificaron 6 horas más tarde y se procedió a valorar el volumen de exudado. El tipo y número de células se determinó con una tinción estándar de Wright-Giemsa y un contador de células Coulter Counter, respectivamente. El exudado fue centrifugado a 400 x g a 4 °C durante 7 min y la concentración de PGE<sub>2</sub> se determinó mediante una técnica de enzima-inmunoensayo (Amershan-Biotrak RPN222). El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de NaCl 0,85% frío. Para eliminar la contaminación con glóbulos rojos las células fueron sometidas a una lisis celular selectiva mediante la adición de 6 ml de agua fría durante 20 segundos. Para restablecer la isotonía de la suspensión celular se adicionaron 2 ml de NaCl 3,5%. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente y el sedimento se resuspendió en tampón

de lisis a una densidad de  $2 \times 10^8$  células para realizar los estudios de inmunoblot (ver Ejemplo 6).

## B. RESULTADOS

5

Los resultados se muestran en la figura 7. La Fig. 7A corresponde a un inmunoblot representativo y la Fig. 7B muestra la media  $\pm$  EE de la cuantificación de  $\text{PGE}_2$  en el exudado de rata ( $n=4$ ). La administración oral de triflusal (3-30 mg/kg) inhibe de forma dosis-dependiente la expresión de la COX-2 en las células presentes en el exudado y la producción de  $\text{PGE}_2$ .

10

Ejemplo 8: Inhibición de la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (monocyte chemotactic protein-1; MCP-1) inducida por inmunocomplejos en la línea monocítica humana THP-1.

15

### A. CULTIVO CELULAR Y DETERMINACIÓN DE NIVELES DE MCP-1

Las células de la línea monocítica humana THP-1 ( $3 \times 10^6$  células/pozo) se cultivaron en placas de plástico con medio de cultivo RPMI 1640 al que se añadió penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), gentamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), glutamina (2 mM) y un 2% de suero fetal bovino inactivado por calor. Las células se cultivaron en presencia de HTB (2 y 4 mM) o vehículo y se activaron con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de agregado de inmunocomplejo (A-IgG). La aparición de MCP-1 soluble se determinó mediante ELISA con un kit comercial (R&D Systems Inc.; Minneapolis, MN). El límite de detección del sistema fue de 5 pg/ml.

20

25

### B. RESULTADOS

30

Los resultados obtenidos en esta prueba se muestran en la figura 8. El HTB, tanto a una concentración de 4 mM como de 2 mM, produce una inhibición completa de la expresión de MCP-1 inducida por inmunocomplejos.



en THP-1.

Ejemplo 9: Inhibición de la expresión de TNF- $\alpha$  inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

#### A. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES HUMANAS.

Las células mononucleares (PBMC) fueron obtenidas a partir de sangre de voluntarios sanos del Hospital de Sant Pau (Barcelona) según el protocolo descrito en el ejemplo 3. Las células se diluyeron a una concentración de 2 millones/ml con medio RPMI al 10% de suero fetal bovino y se incubaron (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) con triflusal, HTB o vehículo (DMSO) en presencia de 10 µg/ml de lipopolisacárido de *E.coli* (LPS, serotipo 026:B6; Sigma) durante 19 horas. Seguidamente la suspensión celular se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante resultante se almacenó a -70°C para su posterior análisis. El contenido de citocina se determinó mediante inmunoensayo enzimático, tras dilución 1/100 de las muestras.

#### B. RESULTADOS

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos con triflusal y HTB en este experimento. Tanto triflusal como HTB (1 y 0,3 mM) producen una inhibición prácticamente completa de la síntesis de TNF- $\alpha$  inducida por LPS. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de 2-5 experimentos independientes, cada punto por triplicado.

Ejemplo 10: Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B en células gliales de ratas post-natales de la estirpe Long Evans black-hooded.

## A. METODOLOGÍA GENERAL

El estudio se realizó en ratas postnatales (P9) de la estirpe Long Evans black-hooded. Cada grupo experimental lo constituyeron 6 animales que sufrieron una lesión experimental, más dos animales controles de la misma edad. La lesión experimental se realizó mediante la inyección intracortical (área sensitomotora) de N-metil-D-aspartato (NMDA), lo que provoca una intensa degeneración neuronal local. El triflusal (30 mg/kg) se administró por vía oral en tres dosis (desde el día 7 al 9) cada 24 horas. La reactividad glial se indujo por la inyección de NMDA al noveno día tras el nacimiento, una hora después de la última dosis de triflusal. A distintas horas (2-24h) tras esta última dosis, los animales se sacrificaron, se extrajeron los cerebros y se cortaron mediante un criostato y estas secciones se procesaron mediante técnicas inmunocitoquímicas e histoquímicas para evaluar la activación de NF- $\kappa$ B en microglía y astrogliá mediante doble marcaje: NF- $\kappa$ B-lectina y NF- $\kappa$ B-GFPA. Paralelamente se realizaron cortes vibratómicos para determinar el grado de reactividad microglial y astrogliá mediante técnicas histioenzimáticas (B. Castellano y cols., *J.Histochem. Cytochem.*, 1991, 39(5), 561-568).

## 20 B. RESULTADOS

En los animales control, las neuronas corticales, pero no las células gliales, mostraron una activación constitutiva de NF- $\kappa$ B. Esta activación basal es inhibida con el pretratamiento con triflusal. En aquellos animales a los que se les practicó una lesión excitotóxica con NMDA se produjo una rápida activación de NF- $\kappa$ B en las células gliales. El pretratamiento con triflusal a 30 mg/kg p.o. inhibe por completo la activación de NF- $\kappa$ B, tanto en astrogliá como en microglía.

Ejemplo 11: Prevención por triflusal de la muerte neuronal inducida en cocultivos de neuronas y astrocitos por privación de oxígeno/glucosa (oxygen/glucose deprivation, OGD)

5 A. METODOLOGÍA GENERAL

Para realizar este estudio se ha utilizado un modelo de isquemia neuronal *in vitro*, basado en cocultivos de neuronas y células gliales. Se realizaron cultivos primarios de astrocitos de tipo 1 obtenidos a partir de ratas

10 Wistar recién nacidas (1 día). Los astrocitos se sembraron en placas de 60 mm, recubiertas con poli-D-lisina. Una vez que estas células alcanzaron la confluencia (aproximadamente 11 días) se sembró sobre ellas neuronas primarias de ratas y se dejaron crecer durante 10 días. Además, se prepararon cultivos de cada uno de los dos tipos celulares por separado.

15 A la mitad de los casos se los sometió a cuatro horas de privación de glucosa y oxígeno (OGD), seguido por un periodo de 24 horas de recuperación. Tanto las células sometidas a OGD como las controles se trataron al inicio de la OGD con 0, 10 y 30 µg/ml de triflusal en un grupo de experimentos y 0, 20 y 100 µg/ml de HTB en otro. Al finalizar las 24 horas de recuperación, se determinó

20 la liberación al medio de lactato deshidrogenasa (LDH) como medida de la muerte celular, el grado de apoptosis de los cultivos (mediante la técnica de TUNEL) y el número total de neuronas y astrocitos presentes en el cocultivo (mediante la tinción de Hoescht).

25 B. RESULTADOS

En los cultivos sometidos a OGD se observó tanto un fuerte incremento en la liberación de LDH como en el número de neuronas apoptóticas, comparados con los controles. Las distintas concentraciones de triflusal o HTB

30 probadas en este estudio inhibieron por completo ambos efectos. Por lo tanto, en este modelo tanto triflusal como su metabolito HTB pueden evitar la

apoptosis y degeneración neuronal provocada por la privación de oxígeno y glucosa.

Ejemplo 12: Inhibición de la artritis inducida por adyuvante en la rata

5

A. INDUCCIÓN DE LA ARTRITIS

La artritis inducida por adyuvante se caracteriza por el desarrollo, a partir del día 14 de la inyección del adyuvante, de una inflamación crónica de origen inmunológico en diversas articulaciones, con acumulación de células inflamatorias y liberación de citocinas.

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado ratas Lewis macho, de peso comprendido entre 100 y 150 g. Antes de iniciar el estudio se sometieron a un período de aclimatación de al menos 5 días. Los animales se mantuvieron en ayunas durante las 18 horas previas a su utilización, con agua *ad libitum*.

Durante el tiempo que duró el estudio se permitió el libre acceso de los animales al agua de bebida, excepto en los períodos de observación.

Se randomizaron diferentes lotes de 5 animales (Blanco, Control y Triflusal). La duración de este protocolo fue de 28 días. El día 1 del estudio se indujo la artritis por la administración subplantar de 0,1 ml de una emulsión formada por 10 mg de *M. butyricum* y 10 ml de adyuvante de Freund incompleto (Difco) en la pata derecha trasera de los animales en los lotes Control y Triflusal. A los animales Blancos se les administró 0,1 ml de adyuvante de Freund incompleto. El triflusal se administró diariamente desde el día 1 del estudio a una dosis de 10 mg/kg p.o. en Tween 80 (1%). El día 28 del desarrollo de la artritis se valoró el volumen de la pata contralateral a la de la inyección del adyuvante de los animales con un plestímetro UGO BASILE 7150. La inhibición del incremento del volumen se calculó de la siguiente forma:

30

$$\% \text{ Inh.} = 100 - ((T-B)/(C-B)) * 100$$

Donde: T = grupo Triflusal; C = grupo Control; y B = grupo Blanco

## B. RESULTADOS

- 5 La administración oral de triflusal durante 28 días a la dosis de 10 mg/kg inhibió un  $63,1 \pm 8,0$  % el incremento de volumen de origen inmunológico inducido por *M. butyricum* y adyuvante en los animales controles.

10 Ejemplo 13: Estudio de la viabilidad de diferentes líneas celulares después de la administración de HTB.

## A. METODOLOGÍA GENERAL

- 15 Diferentes líneas celulares obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) fueron mantenidas en cultivo a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Cada línea celular creció en un medio de cultivo adecuado y dentro de la fase exponencial (Tabla I).

Tabla I

20

LINEA CELULAR	MEDIO CRECIMIENTO
U-937 (linfoma histiocítico humano)	RPMI 1640 + 10% SFB
143.98.2 (osteosarcoma humano)	DMEM + 10% SFB
1321N1 (astrocitoma humano)	DMEM + 5% SFB + 0,5% Penicilina- Estreptomicina

Jurkat (leucemia aguda de células T humana)	RPMI 1640 + 10% SFB
COLO 205 (adenocarcinoma de colón humano)	RPMI 1640 + 10% SFB

Para realizar los estudios de viabilidad celular se utilizaron placas de 24 pozos donde se incubaron  $0,5 \times 10^6$  células/ml (para estudios de 24 horas),  $0,25 \times 10^6$  células/ml (para estudios de 48 horas) o  $0,125 \times 10^6$  células/ml (para estudios de 72 horas). A continuación se añadió diferentes concentraciones de HTB (1-3 mM) y se incubaron las células durante diferentes periodos de tiempo (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Una vez terminada la incubación, se extrajo el sobrenadante de cada pocillo, y se lavaron las células con medio de cultivo sin suero fetal bovino. Seguidamente, se extrajo el sobrenadante y se añadieron 200 µl de medio de cultivo sin suero fetal bovino en cada pozo. También se adicionaron 20 µl de sustrato para medir la viabilidad celular. Este método se basa en la capacidad que poseen las células vivas para transformar el sustrato incoloro en una sustancia coloreada excretada al sobrenadante (EZ4U, Biomedica GmbH.). Después de incubar las células durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se recogieron 200 µl de sobrenadante y se midió la absorbancia a 450 nm. También se midió la absorbancia a 620 nm indicativo del valor inespecífico existente.

## 20 B. RESULTADOS

Los resultados de la medición de la viabilidad se muestran en la Tabla II. La incubación con HTB lleva a la muerte celular de las diferentes líneas tumorales ensayadas. Esta muerte celular se produce de una forma concentración y tiempo dependientes.



Tabla II.- Porcentaje de viabilidad celular.

U-937	0 horas	2 horas	5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1 mM HTB	100	100	98,8	74,4	39,6	4,8
3 mM HTB	100	96,1	92,6	13,9	7,5	N.D.

JURKAT	0 horas	2 horas	5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1 mM HTB	100	100	76,8	11,3	3,6	1,6
3 mM HTB	100	100	62,6	6,2	5,4	N.D.

1321N1	0 horas	2 horas	5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1 mM HTB	100	99,7	94,2	87,5	67,6	N.D.
3 mM HTB	100	85,3	67,2	62,2	17,8	N.D.

COLO 205	0 horas	2 horas	5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1 mM HTB	100	100	87,2	84,8	37,4	7,6
3 mM HTB	100	94,5	69,2	39,6	14,3	N.D.

143.98.2	0 horas	2 horas	5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
1 mM HTB	100	100	100	93,9	83,2	50,4
3 mM HTB	100	98,1	82,7	52,2	16,1	N.D.

N.D.: no determinado

5

Los resultados de los ensayos descritos en los ejemplos 1, 2 y 3 demuestran que el triflusal y el HTB inhiben la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Se demuestra también que esta inhibición es

independiente del agente inductor y del tipo de célula. Estos resultados demuestran la utilidad de triflusal y HTB en el tratamiento o prevención de aquellas patologías en las que el NF- $\kappa$ B se halle implicado.

Los resultados del ejemplo 4 demuestran que el triflusal y el HTB  
5 inhiben la expresión de VCAM-1. Se ha descrito que el gen de VCAM-1 tiene puntos de unión al NF- $\kappa$ B (C. Weber y cols., *Arterioscler. Thromb.* 1994, 14(10), 1665-1673). Se ha demostrado que moléculas de adhesión como VCAM-1 están implicadas en patologías como la aterosclerosis (K.D. O'Brien y cols., *J. Clin. Invest.* 1993, 92, 945-951), artritis reumatoidea, lupus, esclerosis múltiple,  
10 enfermedad inflamatoria intestinal, asma, rinitis alérgica y metástasis de tumores. Al inhibir la activación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de VCAM-1, tanto el triflusal como el HTB podrían ser de especial utilidad en el tratamiento o prevención de las enfermedades mediadas por VCAM-1 como todas las arriba mencionadas y muy especialmente la aterosclerosis.

15 En el ejemplo 5 se demuestra que triflusal y HTB inhiben también la expresión de iNOS, que está regulada a nivel transcripcional, al menos en parte, por el NF- $\kappa$ B (U. Förstermann y cols., *Biochem. Pharmacol.* 1995, 50(9), 1321-1332). Se ha demostrado que la iNOS está implicada en patologías como inflamación, shock séptico, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades  
20 neurodegenerativas como demencia y enfermedad de Parkinson (J. E. Ogden y P.K. Moore, *Trends Biotechnol.* 1995, 13(2), 70-78). Al inhibir la activación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de iNOS, el triflusal y el HTB podrían ser de especial utilidad en el tratamiento o prevención de las enfermedades mediadas por la iNOS y en especial inflamación, shock séptico, enfermedad inflamatoria  
25 intestinal y enfermedades neurodegenerativas como demencia y enfermedad de Parkinson.

Los resultados de los ejemplos 6 y 7 demuestran que el triflusal y HTB inhiben la expresión de la COX-2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha descrito que el gen que codifica la COX-2 tiene puntos de unión al NF- $\kappa$ B (S.B. Appleby  
30 y cols., *Biochem. J.* 1994, 302, 723-727). Se ha relacionado la COX-2 con patologías como artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico,

artrosis, parto prematuro, demencia, especialmente la enfermedad de Alzheimer (T.A. Sandson y O. Felician, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 1998, 7(4), 519-526) y cáncer (M. Oshima y cols., *Cell* 1996, 87(5), 803-809; K. Subbaramaiah y cols., *Cancer Res.* 1996, 56(19), 4424-4429). Al inhibir la activación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de la COX-2, el triflusal y el HTB podrían ser de especial utilidad en el tratamiento o prevención de patologías mediadas por la COX-2 y más especialmente artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, artrosis, parto prematuro, demencia y cáncer.

Los resultados del ejemplo 8 demuestran que el HTB inhibe también la expresión de MCP-1, que está regulada a nivel transcripcional, al menos en parte, por el NF- $\kappa$ B (T. Martin y cols., *Eur. J. Immunol.* 1997, 27(5), 1091-1097). Se ha descrito que una producción excesiva o no regulada de MCP-1 está implicada en patologías como glomerulonefritis (B.H. Rovin y cols., *Lab. Invest.* 1994, 71(4), 536-542), artritis reumatoidea (P.M. Villiger y cols., *J. Immunol.* 1992, 149(2), 722-727), fibrosis pulmonar (H.N. Antoniades y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89(12), 5371-5375), restenosis, asma, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple y rechazo de trasplantes, y constituye el factor quimiotáctico más potente detectado en placas de ateroma ricas en macrófagos (S. Yla-Herttuala y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88(12), 5252-5256). Al inhibir la activación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de MCP-1, el triflusal y el HTB podrían ser de especial utilidad en el tratamiento o prevención de las enfermedades mediadas por la MCP-1 como las arriba mencionadas.

Los resultados del ejemplo 9 demuestran que triflusal y HTB inhiben también la expresión del TNF- $\alpha$ , que está regulada a nivel transcripcional, al menos en parte, por el NF- $\kappa$ B (J. Yao y cols., *J. Biol. Chem.* 1997, 272(28), 17795-17801). Se ha descrito que una producción excesiva o no regulada de TNF- $\alpha$  está implicada en un amplio abanico de patologías como artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa y otras enfermedades artríticas, artrosis, sepsis, shock séptico, shock endotóxico, síndrome de shock tóxico, síndrome del distrés respiratorio del adulto, malaria cerebral, enfermedad

inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar, hepatitis, osteoporosis y otras enfermedades relacionadas con la resorción ósea, daño por reperfusión, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, lupus, fiebre y mialgias debidas a infecciones, caquexia, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad inflamatoria intestinal y piresis (L. Sekut y K.M. Connolly, Drug News Perspect. 1996, 9(5), 261-269). Al inhibir la activación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de TNF- $\alpha$ , el triflusal y el HTB podrían ser de especial utilidad en el tratamiento o prevención de las enfermedades mediadas por el TNF- $\alpha$  como las arriba mencionadas.

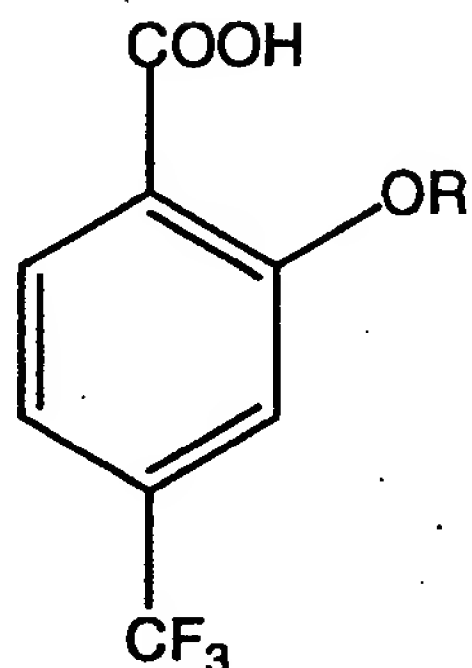
10 Los resultados de los ejemplos 11, 12 y 13 demuestran adicionalmente la utilidad del triflusal y HTB para el tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas, artritis y cáncer, respectivamente.

Las concentraciones en las que se observan efectos en los experimentos descritos en los ejemplos 1 a 13 se alcanzan a las dosis terapéuticas de triflusal empleadas habitualmente en humanos por vía oral.

15 Sin querer quedar vinculados por lo que aquí se expresa, se cree que la inhibición de la expresión de proteínas como VCAM-1, iNOS, COX-2, MCP-1 y TNF- $\alpha$  por parte del triflusal y el HTB está mediada, al menos en parte, por una inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Esto no obstante, se sabe que la expresión de los genes que codifican estas proteínas puede ser activada por otros agentes. Al haber demostrado que tanto triflusal como HTB inhiben la expresión de estos genes (tanto *in vitro* como *in vivo*, en el caso de la COX-2), ambos productos podrían ser útiles también en el tratamiento o prevención de patologías en las que exista una elevada expresión de estos genes independiente de NF- $\kappa$ B, que forma también parte del ámbito de la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula I



(I)

- 5 donde R representa hidrógeno o  $\text{COCH}_3$ , o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
- 2.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de genes dependientes y/o regulados al menos en parte a través del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
- 10 3.- Uso según la reivindicación 2 donde el gen es un gen seleccionado de entre el gen que codifica la COX-2, iNOS, VCAM-1, MCP-1 o TNF- $\alpha$ .
- 15 4.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de patologías asociadas a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o la expresión de genes dependientes de NF- $\kappa$ B.
- 20 5.- Uso según la reivindicación 4 donde la patología es seleccionada de entre inflamación, asma, síndrome del distrés respiratorio del adulto, una enfermedad inmunoinflamatoria o autoinmune, artrosis, shock séptico, aterosclerosis, cáncer, osteoporosis, parto prematuro, rechazo de trasplantes, una enfermedad neurodegenerativa e infecciones víricas.

6.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de la COX-2.

5 7.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la COX-2.

10 8.- Uso según la reivindicación 7 donde la enfermedad mediada por la COX-2 es artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, artrosis, parto prematuro, demencia o cáncer.

15 9.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de VCAM-1.

10.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por VCAM-1.

20 11.- Uso según la reivindicación 10 donde la enfermedad mediada por VCAM-1 es aterosclerosis, artritis reumatoidea, lupus, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, rinitis alérgica o metástasis de tumores.

25 12.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de la iNOS.

30 13.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la iNOS.

14.- Uso según la reivindicación 13 donde la enfermedad mediada por la iNOS es inflamación, shock séptico, enfermedad inflamatoria intestinal o una



enfermedad neurodegenerativa.

15.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión del TNF- $\alpha$ .

16.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por el TNF- $\alpha$ .

17.- Uso según la reivindicación 16 donde la enfermedad mediada por el TNF- $\alpha$  es artritis reumatoidea, espondilitis reumatoidea, artritis gotosa y otras enfermedades artríticas, artrosis, sepsis, shock séptico, shock endotóxico, síndrome de shock tóxico, síndrome del distrés respiratorio del adulto, malaria cerebral, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, fibrosis pulmonar, hepatitis, osteoporosis y otras enfermedades relacionadas con la resorción ósea, daño por reperfusión, rechazo de trasplantes, esclerosis múltiple, lupus, fiebre y mialgias debidas a infecciones, caquexia, síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedad inflamatoria intestinal o piresis.

18.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento útil para inhibir la expresión de la MCP-1.

19.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por la MCP-1.

20.- Uso según la reivindicación 19 donde la enfermedad mediada por la MCP-1 es aterosclerosis, glomerulonefritis, artritis reumatoidea, fibrosis pulmonar, restenosis, asma, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple y rechazo de trasplantes.

21.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas.

5 22.- Uso según la reivindicación 21 donde la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad seleccionada de entre demencia, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica.

10 23.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades inmunoinflamatorias o autoinmunes.

15 24.- Uso según la reivindicación 23 donde la enfermedad inmunoinflamatoria o autoinmune es una enfermedad seleccionada de entre artritis reumatoidea y otras enfermedades de tipo artrítico, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y glomerulonefritis.

25.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la artrosis.

20 26.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer.

25 27.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la aterosclerosis.

30 28.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la inflamación.

29.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la

reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del asma o el síndrome del distrés respiratorio del adulto.

5 30.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del shock séptico.

10 31.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para la prevención de parto prematuro.

15 32.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de la osteoporosis.

33.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención de infecciones víricas.

20 34.- Uso de un compuesto de fórmula I según se ha definido en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco del mismo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o prevención del rechazo de trasplantes.

1/9

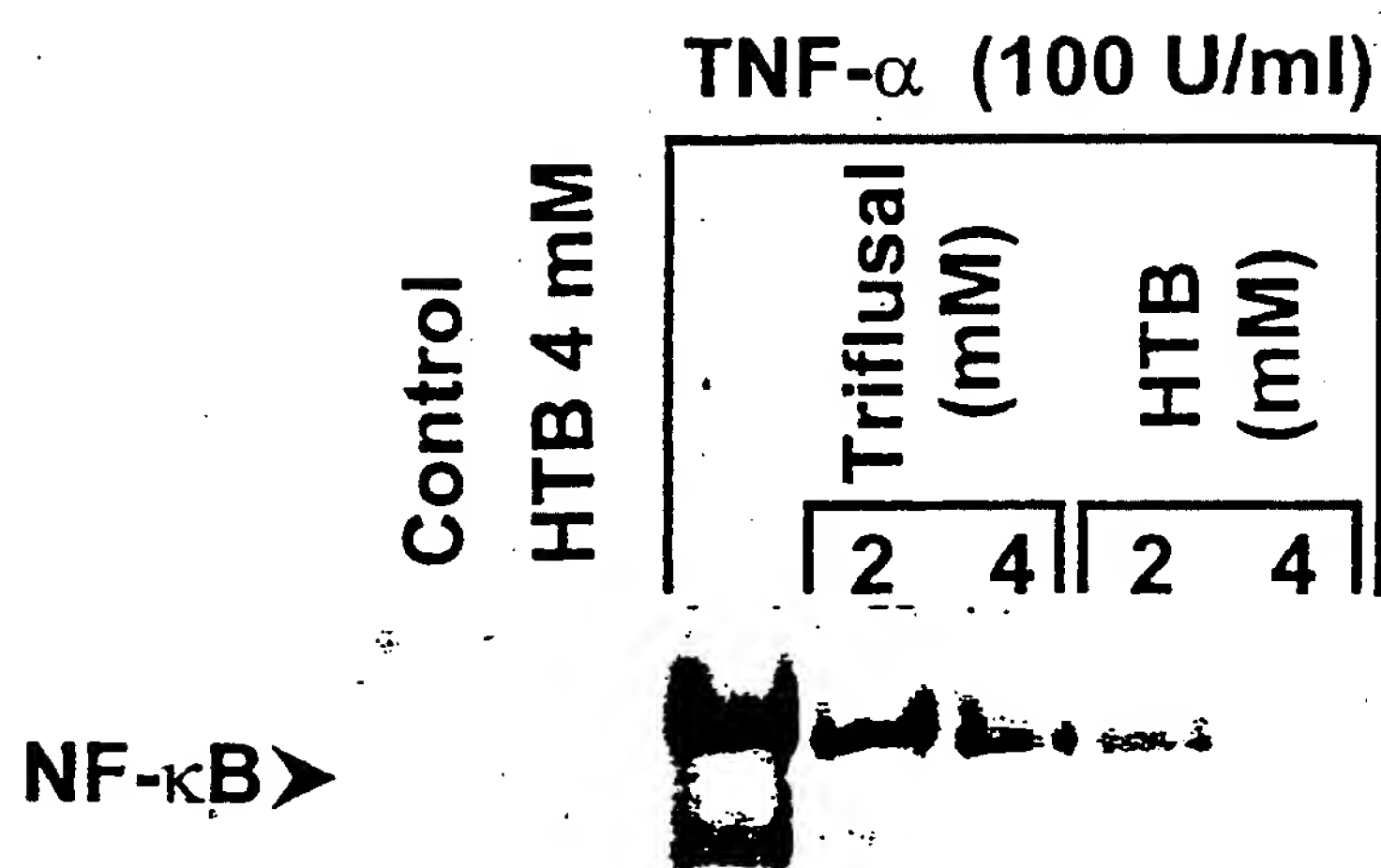
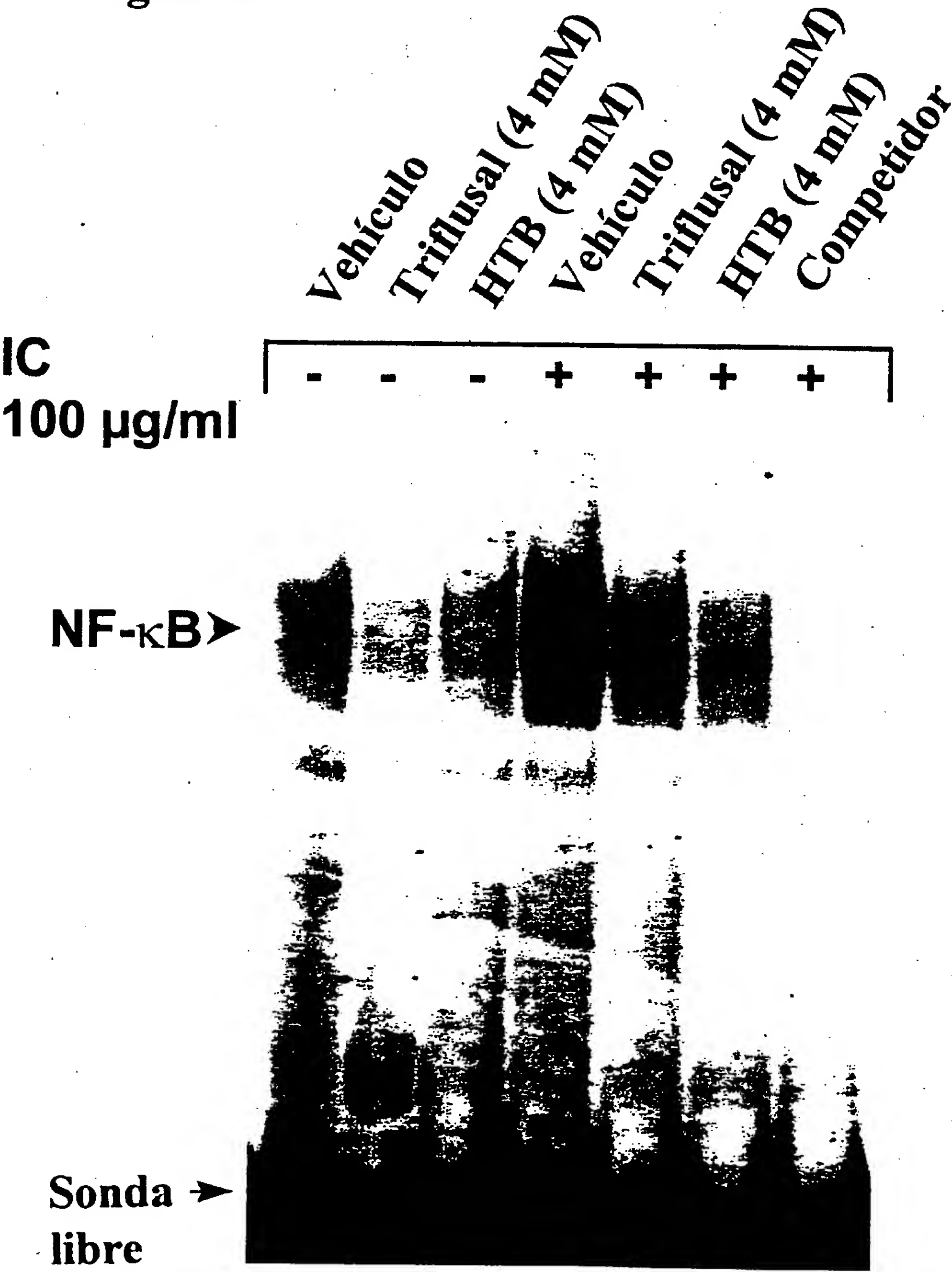
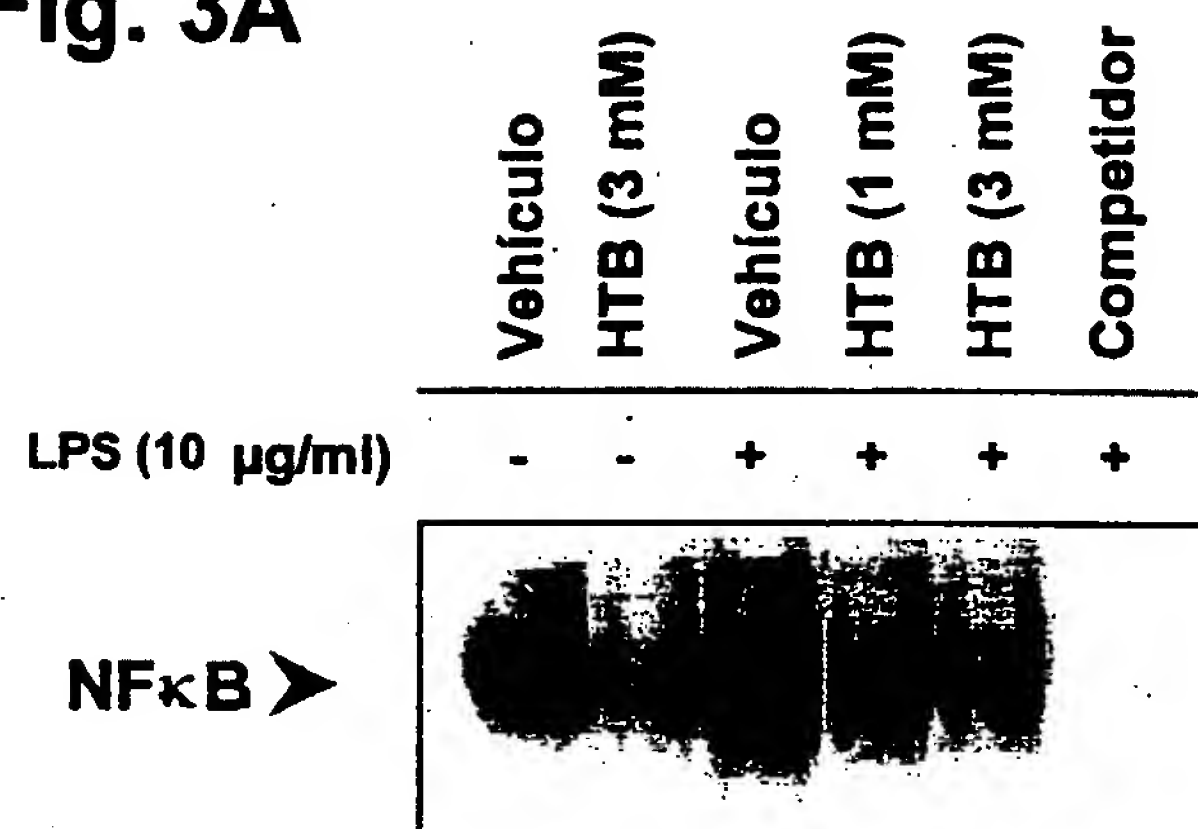
**Figura 1**

Figura 2.

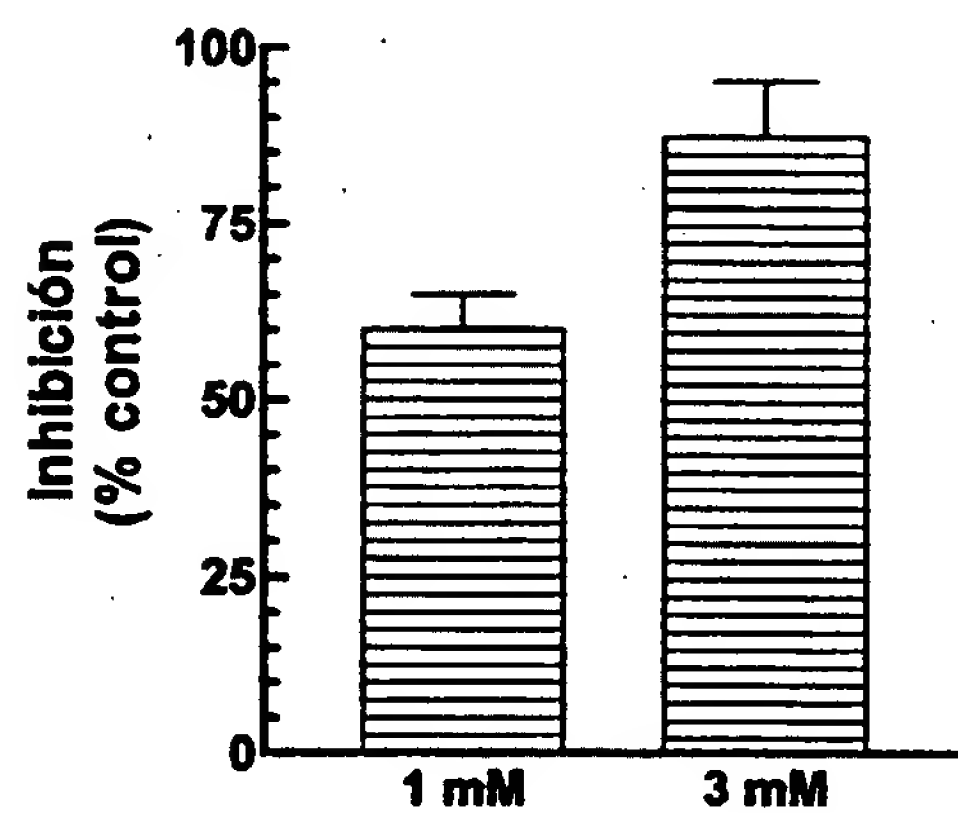
2/9



**Fig. 3A**

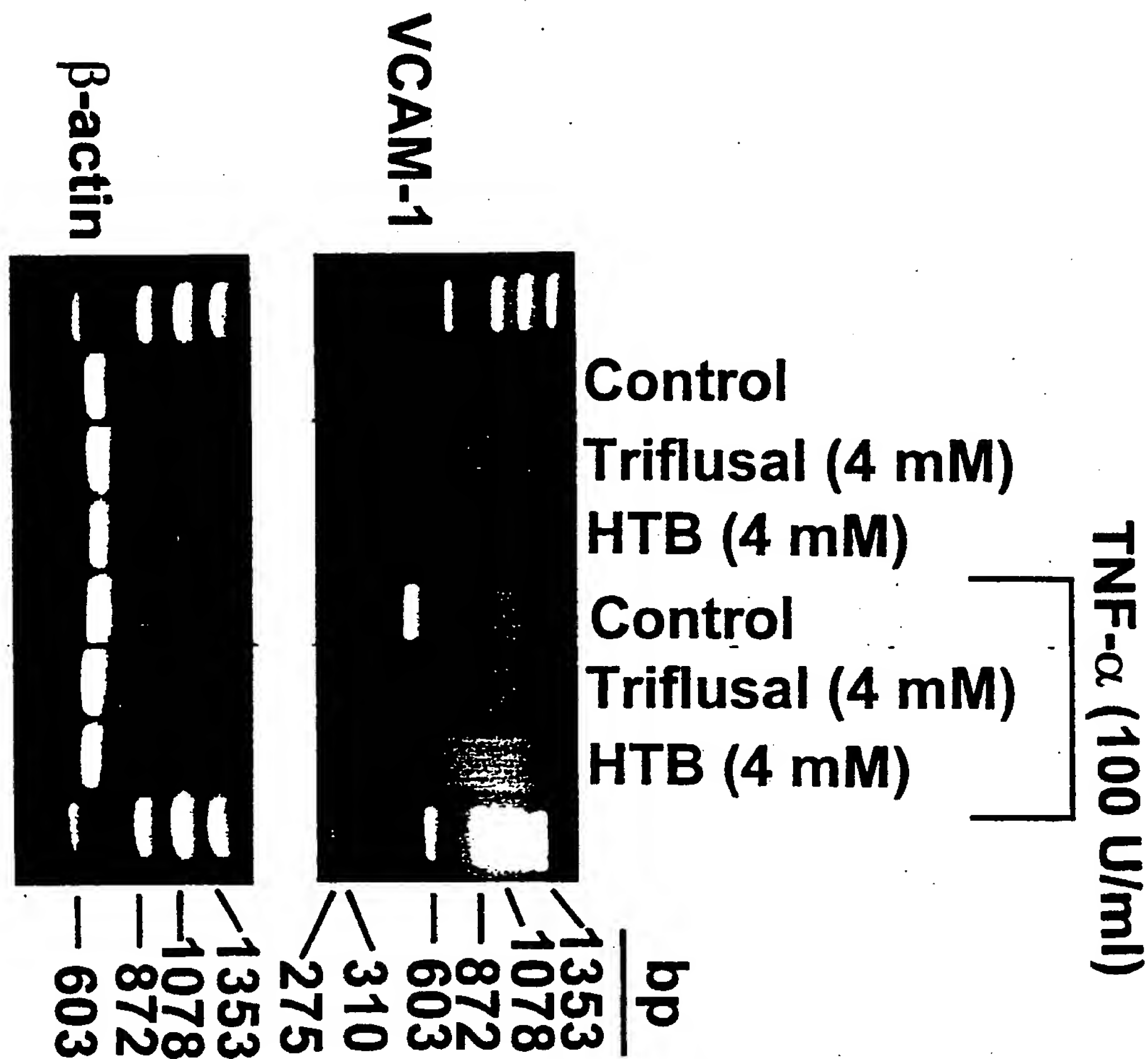


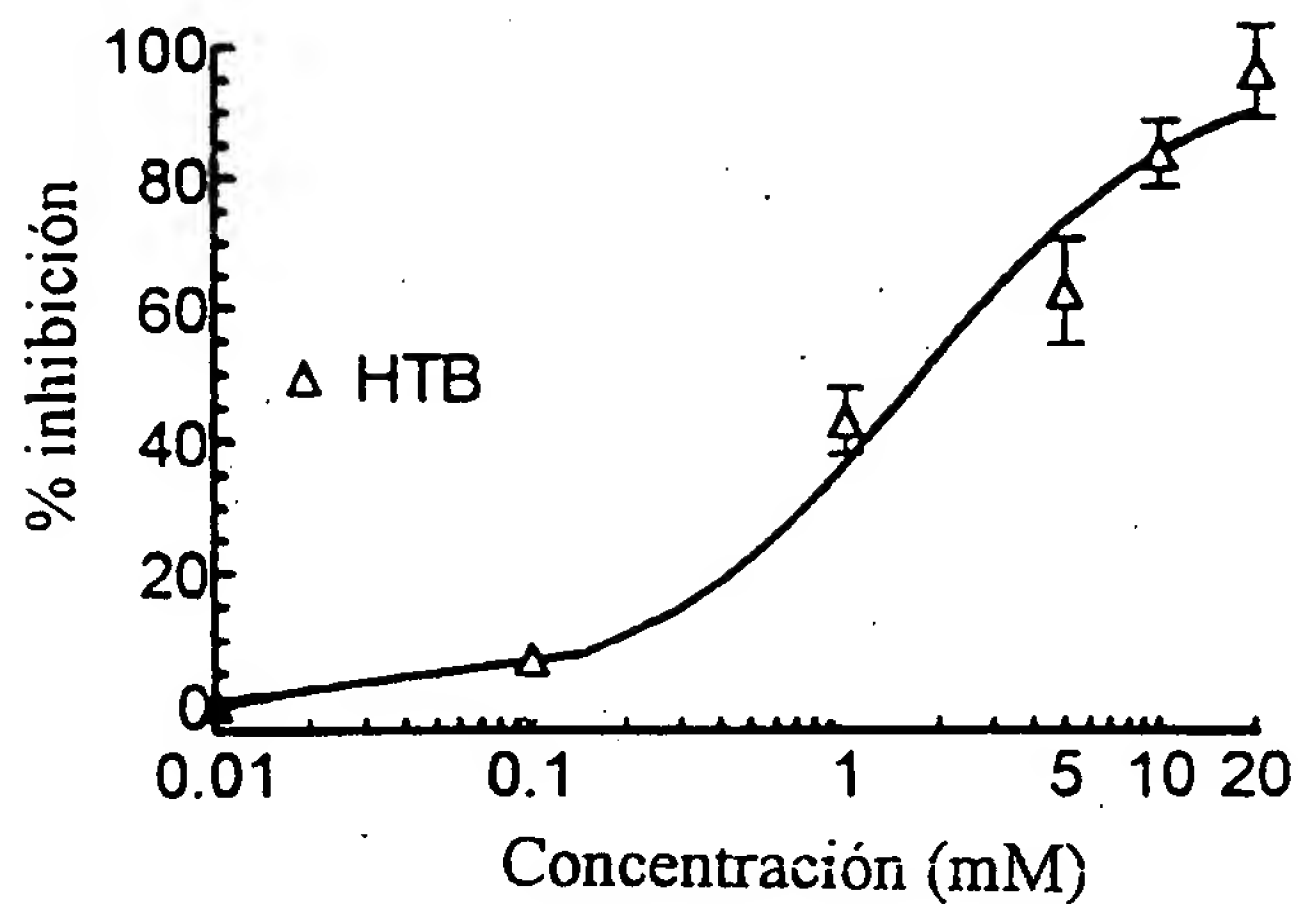
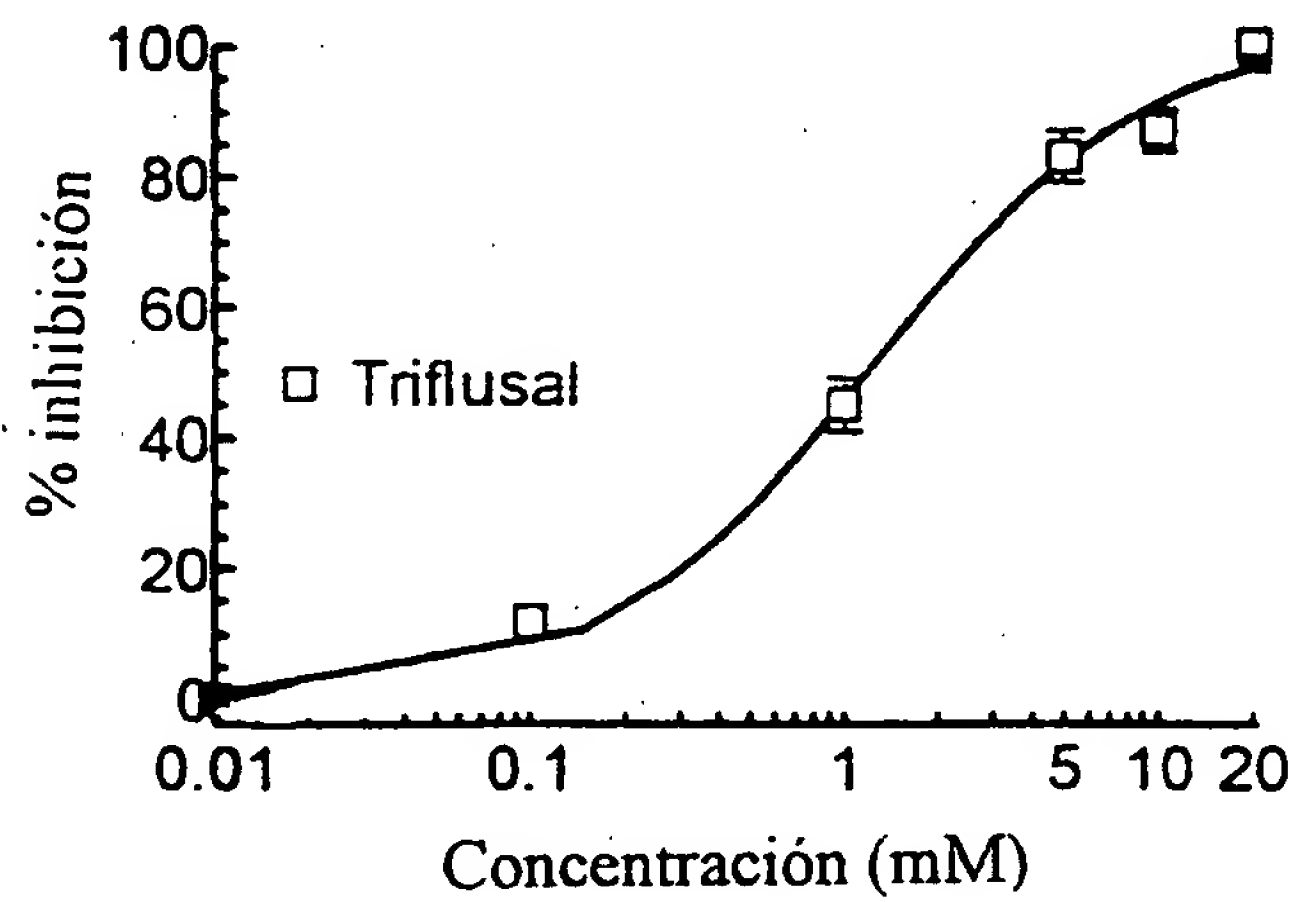
**Fig. 3B**

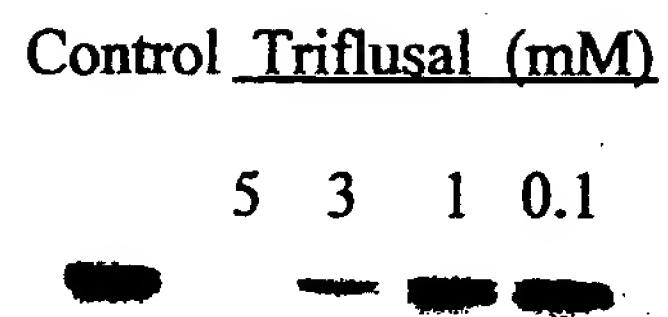
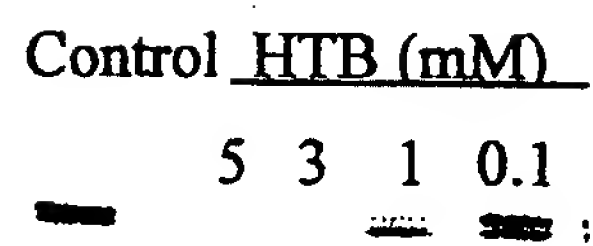
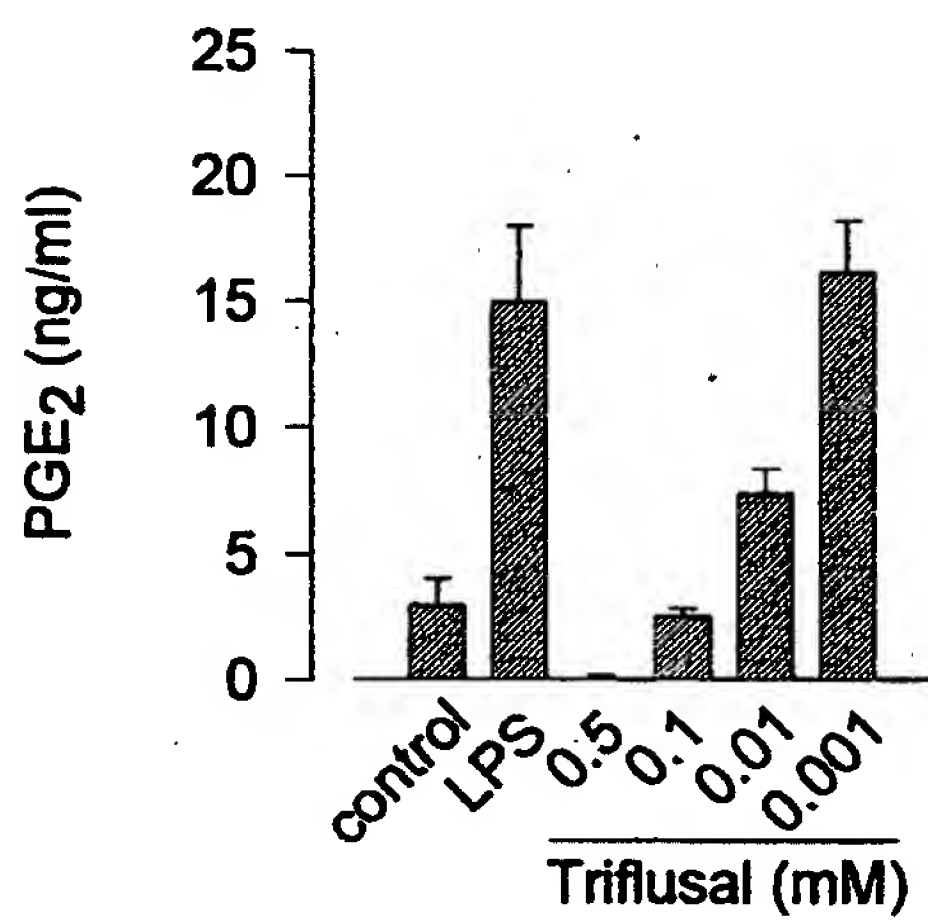
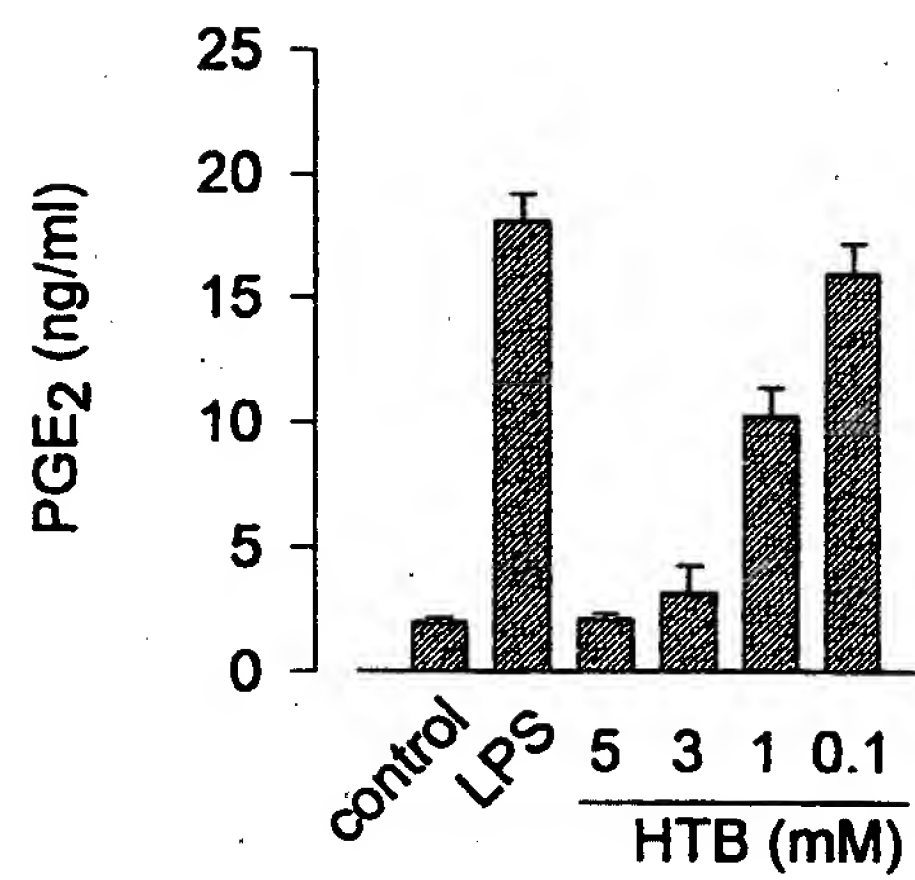




**Figura 4.**



**Fig. 5A****Fig. 5B**

**Fig. 6A****Fig. 6B****Fig. 6C****Fig. 6D**

Control Triflusal (mg/kg , p.o.)  
3 10 30



Fig. 7A

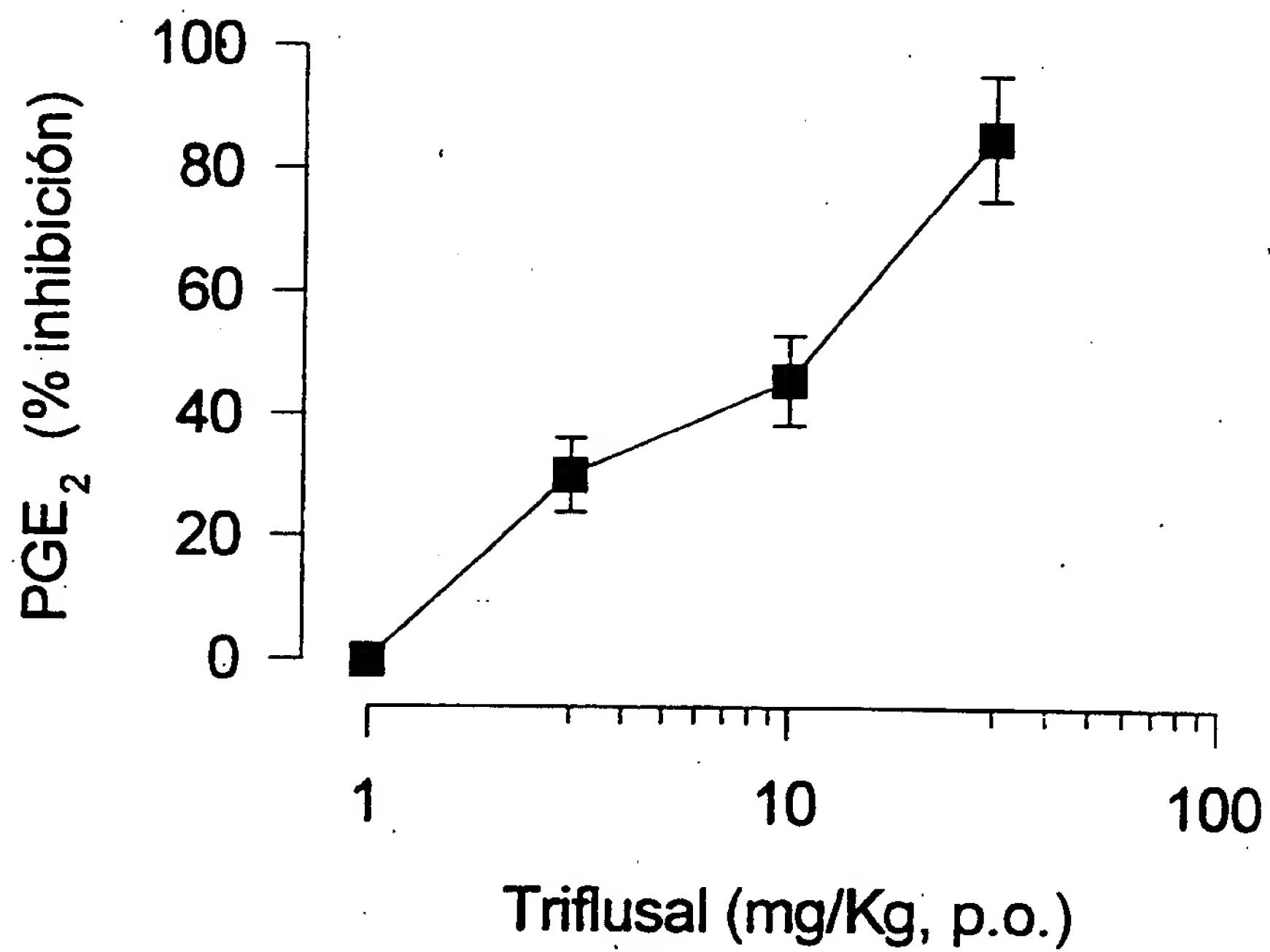


Fig. 7B

Figura 8

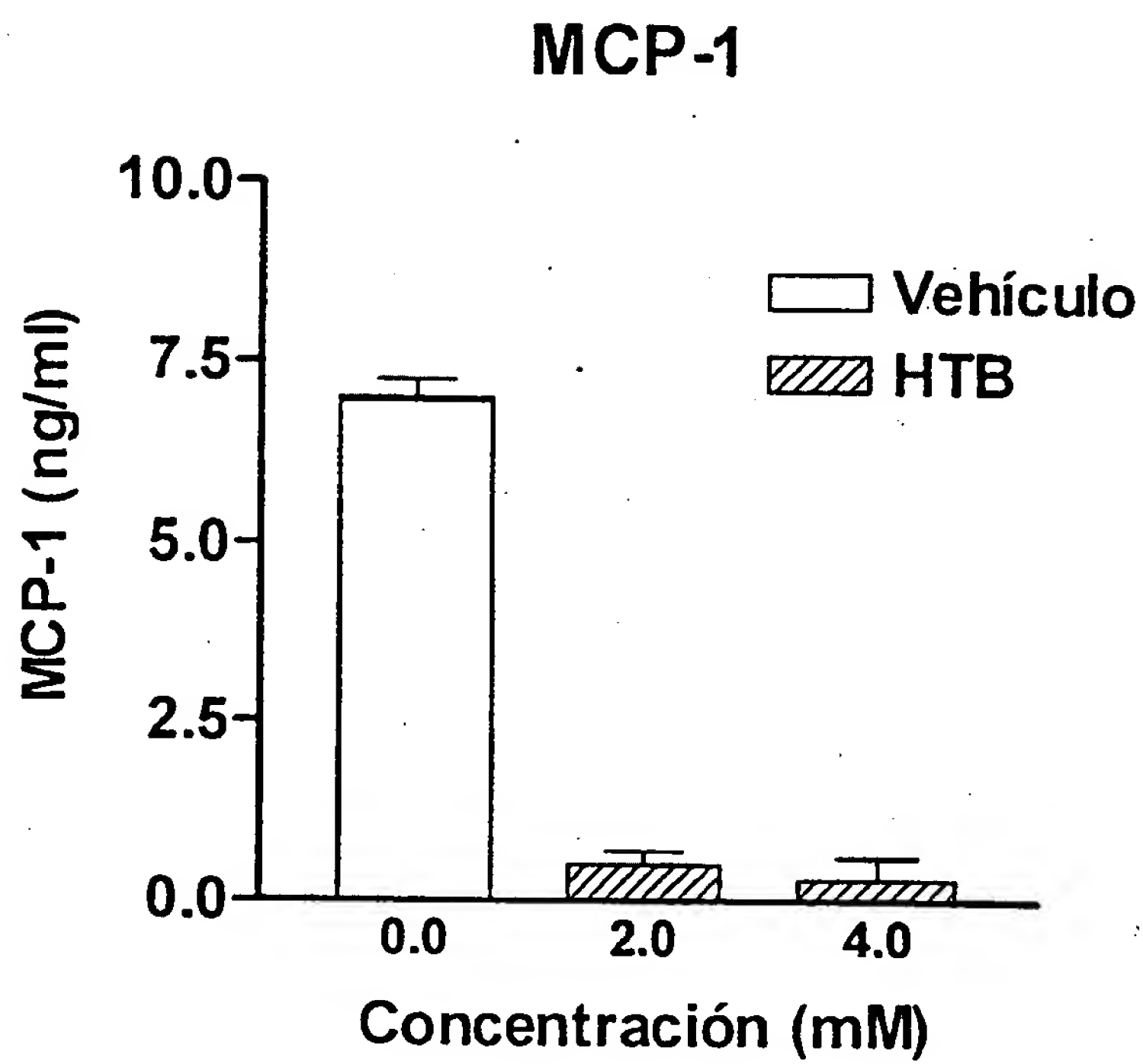
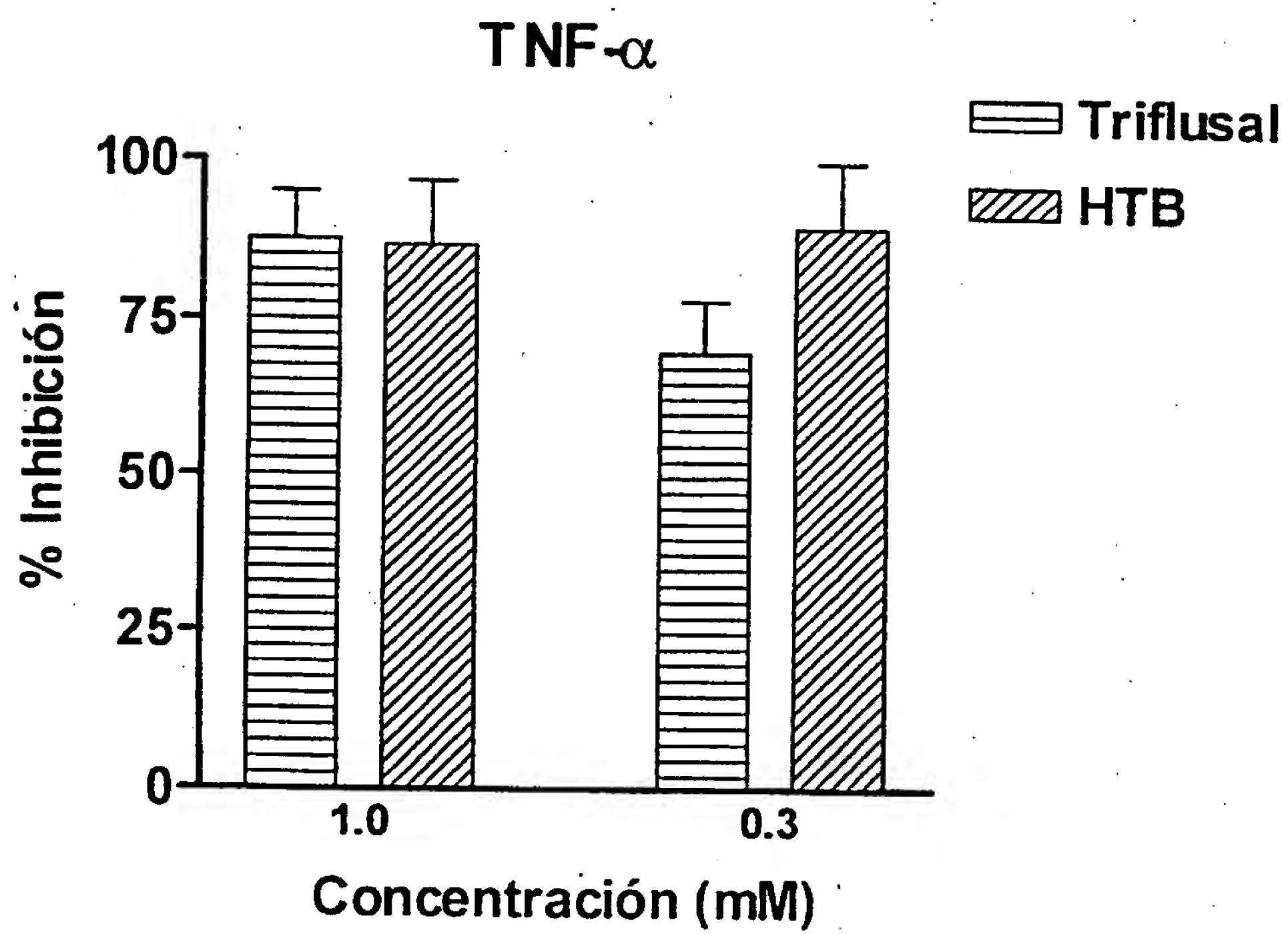


Figura 9





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 99/00154

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 A61 K 31/60 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CA, BEILSTEIN, REGISTRY, EPODOC, CIBEPAT, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GARCIA-RAFANELL TRIFLUSAL IN THE PREVENTION OF CEREBROVASCULAR OCCLUSION : FROM EXPERIMENTAL TO CLINICAL J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1995, Vol. 54 (Suppl.) Page 365-395, preamble and conclusion	1-34
A	CRUZ, J.P. and col. Effects of trifusal and its main metabolite HTB on platelet interaction with subendothelium in healthy volunteers Eur. J. Clin. Pharmacol., 1995, Vol. 47, N°6, page 497-502	1-34
A	US 4096252 A (BARRA and col.) 20.June.1978 (20.06.78) Column 1, line 23-line 42	1-34
A	KOPP. Ey GHOSH S. Inhibition of NF-KB by Sodium Salicylate an Aspirin Science, August 1994, Vol. 265, page 956-959	1-34 1-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 August 1999 (03.08.99)		Date of mailing of the international search report 6 September 1999 (06.09.99)
Name and mailing address of the ISA S.P.T.O		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/ES 99/00154**C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEBER, C. and COL. Aspirin Inhibits Nuclear Factor-kB Mobilization and Manocyte Adhesion in Stimulated Humma Endothelial Cell Circulation, April 1995, Vol. 91 N°7, page 1914-1917	9-11 15-17
A	GRILLI, M. and col. Neuroprotection by Aspirin and Sodium Salicylate Through Blockade of NF-kB Activation Science, November 1996, Vol, 274, page 1383-1385	1-34
A	PIERCE, W.J. and col. Salicylates inhibit IkB- Phosphorylation, Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule Expression, and Neutrophil Transmigration The Journal of Immunology, 1996, Vol 156 page 3961-3969	1-34
A	SOVAK, M.A. and col. Aberrant Nuclear Factor-kB/Rel Expression and the Pathogenesis of Breast Cancer J.Clin. Inverst. Decembre 1997, Vol. 100, N°12 page 2952-2960	1-34

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ ES 99/00154

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>6</sup> A61K 31/60

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>6</sup>

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CA, BEILSTEIN, REGISTRY, EPODOC, CIBEPAT, EMBASE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	GARCIA-RAFANELL TRIFLUSAL IN THE PREVENTION OF CEREBROVASCULAR OCCLUSION: FROM EXPERIMENTAL TO CLINICAL J. Neuropathol. Exp. Neurol., 1995, Vol. 54 (Suppl.) Pág. 365-395, preámbulo y conclusión	1-34
A	CRUZ, J.P. y col. Effects of triflusal and its main metabolite HTB on platelet interaction with subendothelium in healthy volunteers Eur. J. Clin. Pharmacol., 1995, Vol. 47, N° 6, pág. 497-502	1-34
A	US 4096252 A (BARRA y col.) 20.06.1978 Columna 1, línea 23-línea 42	1-34

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 3 Agosto 1999 (03.08.1999)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

06 SEP 1999

(06.09.99)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

ELENA ALBARRAN

n° de teléfono + 34 91 3495595

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES99/00154

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	KOPP, E y GHOSH S. Inhibition of NF-kB by Sodium Salicylate and Aspirin Science, Agosto 1994, Vol. 265, pág. 956-959	1-34
A	WEBER, C. Y col. Aspirin Inhibits Nuclear Factor-kB Mobilization and Monocyte Adhesion in Stimulated Human Endothelial Cell Circulation, Abril 1995, Vol. 91, N° 7, pág. 1914-1917	9-11 15-17
A	GRILLI, M. Y col. Neuroprotection by Aspirin and Sodium Salicylate Through Blockade of NF-kB Activation Science, Noviembre 1996, Vol. 274, p. 1383-1385	1-34
A	PIERCE, W.J. y col. Salicylates inhibit I $\kappa$ B- $\alpha$ Phosphorylation, Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule Expression, and Neutrophil Transmigration The Journal of Immunology, 1996, Vol 156, pág. 3961-3969	1-34
A	SOVAK, M.A. y col. Aberrant Nuclear Factor-kB/Rel Expression and the Pathogenesis of Breast Cancer J. Clin. Invest. Diciembre 1997, Vol. 100, N° 12 pág. 2952-2960	1-34